

**Verbesserung des Energiestoffwechsels  
von kontinuierlichen Zelllinien durch die Einführung  
einer Hefe-Pyruvat-Carboxylase**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von

**Noushin Irani**

aus Teheran



1. Referent: Priv. Doz. Dr. R. Wagner

2. Referent: Prof. Dr. W.-D. Deckwer

eingereicht am: 14.10.1999

mündliche Prüfung am 17.01.2000

2000

**Meinen Eltern  
in Dankbarkeit  
gewidmet**



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1996 bis September 1999 in der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig unter wissenschaftlicher Betreuung von Herrn Priv. Doz. Dr. Roland Wagner angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. R. Wagner, der mir eine sehr interessante Themenstellung zur Auswahl gelassen hat und durch seine Betreuung, seine Begeisterungsfähigkeit und ständige Diskussionsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Der Firma Roche Diagnostics GmbH danke ich für die großzügige Bereitstellung von finanziellen und materiellen Mitteln für die Untersuchung dieser Themenstellung.

Ein großes Dankeschön möchte ich an Dr. Manfred Wirth aussprechen, der den genetischen Teil dieser Arbeit durch seine zahlreichen Anregungen und Hilfestellungen ermöglicht hat. Dr. Joop van den Heuvel möchte ich für seine praktischen Hinweise und seine ausgezeichnete Betreuung bei der Durchführung der Northern Blot Analysen danken.

Herrn Dr. Harald Conradt danke ich für seine Unterstützung bei Fragen zur Glycosylierung und zum EPO sowie für die Bereitstellung von Materialien aus seinem Labor. Ebenso danke ich Frau Maria Höxter, die alle FACS-Analysen durchgeführt hat.

Den Mitarbeitern der Abteilung Zellkulturtechnik bin ich zu großem Dank verpflichtet für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und ihre tatkräftige Unterstützung bei allen Fragen. Insbesondere möchte ich dabei Herrn Herbert Krafft danken, der für die Aufzucht und das Einfrieren der Zellklone viele Stunden an der Clean Bench verbracht hat. Herrn Joachim Hammer danke ich für die unzähligen Aminosäureanalysen und Herrn Gerd-Walter Piehl für die Hilfe bei allen fermentertechnischen Fragen. Herrn Christof Schulz bin ich für seine ständige Hilfsbereitschaft und das Korrekturlesen dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet. Außerdem möchte ich Herrn Alejandro Beccaria hervorheben, der mit einigen Untersuchungen zur Produktivität der Zelllinien zu dieser Arbeit beigetragen hat. Bei Herrn Uwe Carl möchte ich mich für die Einweisung in die Immunoblot- und PCR-Arbeiten bedanken sowie für seine Motivierung am Anfang der Arbeit.

Prof. J. C. Wallace und F. Ahmad danke ich für ihre zahlreichen Anregungen in Fragen der Pyruvat-Carboxylase und Dr. Rolf Stucka für die Bereitstellung der PYC2 cDNA.

Der GBF danke ich für die guten Arbeitsbedingungen sowie die Bereitstellung von Materialien und finanziellen Mitteln.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihre vielseitige Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben.



---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Primärstoffwechsel von kontinuierlichen Säugerzellen</b>	<b>1</b>
1.1.1	Glucosestoffwechsel - Glycolyse und Pentosephosphat Shunt	2
1.1.2	Glutaminolyse - Die Energie- und Ammoniumquelle	5
1.1.2.1	Ammonium als Zelltoxin	7
1.1.3	Der Aminosäurestoffwechsel	8
<b>1.2</b>	<b>Prozeßoptimierung durch Metabolic Control und Metabolic Design</b>	<b>9</b>
<b>1.3</b>	<b>Strategie zur Einführung einer rekombinanten Pyruvat-Carboxylase zur Optimierung des Energiemetabolismus</b>	<b>12</b>
<b>1.4</b>	<b>Eigenschaften und Isoenzyme der Hefe-Pyruvat-Carboxylase</b>	<b>15</b>
<b>1.5</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Zellkultivierung</b>	<b>20</b>
2.1.1	Zellen	20
2.1.1.1	Säugerezelllinien	20
2.1.1.2	Insektenzellen	21
2.1.1.3	Primärzellen	21
2.1.1.4	Bakterienstämme	22
2.1.2	Nährmedien und Medienzusätze	22
2.1.2.1	Säugerezellnährmedien und Supplemente	22
2.1.2.2	Nährmedien für <i>E.coli</i>	23
2.1.3	Stammhaltung und Kultivierung	24
2.1.3.1	Stammhaltung von Säugerezellen	24
2.1.3.2	Kultivierung von <i>E.Coli</i> -Stämmen	25
2.1.4	Bioreaktorsystem	26
2.1.4.1	Rührreaktor mit blasenfreier Begasung	26
<b>2.2</b>	<b>Begleitende Analytik bei Säugerezellkultivierungen</b>	<b>27</b>
2.2.1	Bestimmung der Lebendzellzahlen und Vitalität	27
2.2.2	Zellkernzählung	27
2.2.3	Bestimmung der Zellzahlen mit dem CASY	27
2.2.4	Zellvolumenbestimmung	28
2.2.5	Bestimmung des zellulären Proteingehaltes	28
2.2.6	Quantitative Bestimmung der Glucose und Lactatkonzentration	28
2.2.7	Quantitative Bestimmung freier Aminosäuren	29
2.2.8	Bestimmung des Ammoniumgehalts	29
2.2.9	Nukleotidanalytik	29



2.2.9.1	Extraktion intrazellulärer Nukleotide aus Säugerzellen . . . . .	29
<b>2.3</b>	<b>Bestimmung der Pyruvat-Carboxylase Enzymaktivität . . . . .</b>	<b>30</b>
2.3.1	Extraktionspuffer . . . . .	30
2.3.2	Aufschlußmethode für Säugerzelllinien und Primärzellen . . .	30
2.3.3	Enzymtest und Meßmethodik . . . . .	30
2.3.4	Auswertung der Enzymaktivität . . . . .	31
<b>2.4</b>	<b>Immunoblot Nachweis der Pyruvat-Carboxylase . . . . .</b>	<b>32</b>
2.4.1	SDS-PAGE Elektrophorese . . . . .	32
2.4.2	Semi-dry Blotverfahren der Polyacrylamidgele . . . . .	32
2.4.3	Immunreaktion . . . . .	33
2.4.4	Nachweis der Immunreaktion über Chemolumineszenz . . .	33
<b>2.5</b>	<b>Erythropoetin Analytik . . . . .</b>	<b>34</b>
2.5.1	Quantifizierung der Erythropoetin Konzentration . . . . .	34
2.5.2	Aufreinigung von rhuEPO durch Immunaффinitäts- chromatographie . . . . .	35
2.5.3	Probenvorbereitung für den Nachweis von rhuEPO durch Western Blot Analyse . . . . .	35
2.5.4	PNGase F-Verdau von rhuEPO . . . . .	36
<b>2.6</b>	<b>Messung intrazellulärer Fluxe radioaktiv markierter Substrate in den Citratcyclus . . . . .</b>	<b>36</b>
2.6.1	Glucoseflux und Pyruvatflux in den Citratcyclus . . . . .	36
2.6.2	Messung von $^{14}\text{CO}_2$ Freisetzungsraten . . . . .	36
<b>2.7</b>	<b>Berechnete Größen . . . . .</b>	<b>38</b>
2.7.1	Spezifische Wachstumsrate . . . . .	38
2.7.2	Produktbildungs- und Substratverbrauchsrate . . . . .	38
2.7.3	Berechnung der Produktausbeute in einem kontinuierlich perfundierten Reaktor . . . . .	40
2.7.4	Berechnung nukleotidspezifischer Kennzahlen . . . . .	40
2.7.5	Mittelwert, Standardabweichung und Konfidenzintervall . . .	41
<b>2.8</b>	<b>Vektorkonstruktion und molekularbiologische Arbeiten . . . .</b>	<b>42</b>
2.8.1	Strategie zur Konstruktion eines PYC2-Vektors für die Transfektion von Säugerzellen . . . . .	42
2.8.1.1	Hefevektor YEP352 . . . . .	43
2.8.1.2	Entfernung von Hefesequenzen mit Hilfe von PCR-Techniken . . . . .	43
2.8.2	Konstruktion eines bicistronischen Vektors mit rhuEPO und EGFP als Reporterprotein . . . . .	51
2.8.2.1	Konstruktion des Plasmids pSBC-1-EGFP . . . . .	52
2.8.2.2	Konstruktion des Plasmids pSBC-2-rhuEPO . . . . .	52
2.8.2.3	Konstruktion des Vektors pSBC-EGFP-rhuEPO . . . . .	52
2.8.3	Transformation . . . . .	53
2.8.4	Transfektion von Säugerzellen . . . . .	54
2.8.5	Northern Blot Analyse . . . . .	54
2.8.5.1	RNA Isolierung mit dem RNeasy Kit und Gelelektrophorese	54
2.8.5.2	Transfer der RNA auf einem Hybond N Filter . . . . .	55
2.8.5.3	Random Primer Herstellung der DNA-Sonde . . . . .	55
2.8.5.4	Hybridisierung der RNA Blots . . . . .	57

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>Einführung der Hefe-Pyruvat-Carboxylase in BHK Zellen durch Transfektion</b>	<b>58</b>
3.1.1	Transfektion und Selektion	58
3.1.2	Überprüfung der PYC2 Expression in selektierten Zellklonen	58
3.1.2.1	Überprüfung der Genexpression durch Northern Blot Analyse	60
3.1.2.2	Immunoblot Analyse von PYC2-transfizierten Zellklonen sowie Kontrollzellen	60
3.1.2.3	Enzymaktivitätsbestimmungen	61
<b>3.2</b>	<b>Parameter zur Beurteilung der Wirkung von Hefe-Pyruvat-Carboxylase</b>	<b>62</b>
3.2.1	Wachstum und metabolische Substratverbrauchsrate in Batchkulturen - ein Vergleich zwischen verschiedenen BHK-21 PYC2 Klonen und einer Klonmischung von Kontrollzellen	62
3.2.1.1	Vergleich des Wachstumsverhaltens	63
3.2.1.2	Zellspezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatproduktionsraten	64
3.2.1.3	Zellspezifische Glutaminverbrauchsrate	65
3.2.1.4	Verbleibende Glucose- und Lactatkonzentrationen im Medium	66
3.2.2	Vergleich zwischen BHK-21 PYC2 Klonen und einzelnen Klonen der Kontrollkultur	67
3.2.2.1	Vergleich des Wachstumsverhaltens	67
3.2.2.2	Zellspezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatproduktionsraten	67
3.2.2.3	Zellspezifische Glutaminverbrauchsrate	69
3.2.3	Intrazellulärer Flux radioaktiv markierter Substrate in den Citratcyclus	69
3.2.3.1	Flux von $^{14}\text{C}$ -Glucose und $^{14}\text{C}$ -Pyruvat in den Citratcyclus	70
3.2.4	Wachstum und metabolische Substratverbrauchsrate in kontinuierlichen Kulturen	70
3.2.4.1	Wachstum in kontinuierlicher Kultur	71
3.2.4.2	Substratverbrauchsrate und Endproduktbildungsrate im Chemostaten	72
3.2.4.3	Zellspezifische Sauerstoffverbrauchsrate	75
3.2.4.4	Nukleotidpools	77
3.2.5	Der degenerierte Metabolismus der kontinuierlichen Zelllinien - Vergleich zwischen kontinuierlichen, Insekten- und Primärzellen	84
	<b>Zusammenfassung von 3.1 und 3.2</b>	<b>87</b>
<b>3.3</b>	<b>Untersuchung der Produktionskapazität der mit PYC2 transfizierten Zellen</b>	<b>89</b>

---

3.3.1	Selektion und FACS-Sortierung von rhuEPO exprimierenden Zellen	89
3.3.2	Expressionskontrolle des rhuEPO	90
3.3.3	Untersuchung der rhuEPO Struktur	92
3.3.4	Untersuchung der rhuEPO exprimierenden Zellen in Batchkulturen	93
3.3.4.1	Wachstum und rhuEPO-Produktion	93
3.3.4.2	Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten. rhuEPO-Ausbeute pro verbrauchten Glucoseeinheiten	94
3.3.5	Vergleich der rhuEPO exprimierenden Zellen im Chemostaten	96
3.3.5.1	Zellwachstum	96
3.3.5.2	Zellspezifische rhuEPO-Produktivität und rhuEPO Ausbeute pro verbrauchter Glucose	96
3.3.5.3	Die Gesamt rhuEPO-Ausbeute	99
3.3.5.4	Zellspezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten	100
3.3.6	Wie stabil sind die Expressionsraten während einer Dauerkultivierung?	101
3.3.7	Produktivität des rhuEPO im Perfusionsreaktor	102
3.3.7.1	Wachstumsverhalten	102
3.3.7.2	Zellspezifische rhuEPO-Produktionsraten. Gibt es eine Abhängigkeit der rhuEPO-Produktion von der Glucosekonzentration?	103
3.3.7.3	Gesamtausbeute von rhuEPO	105
3.3.7.4	Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten	106
3.3.7.5	rhuEPO-Ausbeute pro verbrauchter Glucose	107
3.3.8	Produktionsverhalten im Perfusionsreaktor bei identischen Perfusionsraten	108
3.3.8.1	Wachstumsverhalten	108
3.3.8.2	Zellspezifische rhuEPO-Produktivität und Glucosekonzentration im Kulturmedium	109
3.3.8.3	rhuEPO-Konzentration im Perfundat	110
3.3.8.4	Zellspezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten	112
3.3.9	Wachstum und Produktion unter glutaminlimitierten Bedingungen	113
3.3.9.1	Wachstum und Vitalität	114
3.3.9.2	Zellspezifische rhuEPO-Produktivität und die Glutaminkonzentration im Überstand	115
3.3.9.3	Vergleich der Gesamtproduktausbeuten	116
3.3.9.4	Zellspezifische Substratverbrauchsrate	117
	<b>Zusammenfassung von 3.3</b>	<b>119</b>

---

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>121</b>
4.1	Expression der Pyruvat-Carboxylase	122
4.2	Reproduzierbarkeit der Versuche	127
4.3	Wachstumsverhalten	128
4.4	Verbesserte Substratnutzung und Energiebilanz	129
4.4.1	Glucose- und Glutaminverbrauchsdaten	129
4.4.2	Lactatbildungsdaten	130
4.5	Erhöhung der Rate oxidativer Phosphorylierung	131
4.5.1	Flux von Glucose und Pyruvat in den Citratcyclus	131
4.5.2	Sauerstoffbedarf von PYC2 exprimierenden Zellen in kontinuierlich geführten Kulturen	132
4.5.3	Der zelluläre ATP und GTP Gehalt	133
4.5.4	Das Lactat/Glucose Verhältnis	134
4.6	Nukleotidpools der PYC2 exprimierenden Zellen	135
4.6.1	Die zellulären UDPGNAC Gehalte	135
4.6.2	NTP, U und NTP/U Werte	136
4.7	rhuEPO Expression und das Verhalten der Produktivität PYC2 exprimierender Zellen	137
4.7.1	Nachweis der rhuEPO-Expression	137
4.7.2	Stabilität von Zelllinien	138
4.7.3	Produktionsverhalten in Batch und fed-batch Kulturen	139
4.7.4	Verlauf der Produktivitäten in kontinuierlich perfundierten kulturen	140
4.7.5	Industrielle Relevanz und Anwendungsmöglichkeiten	145
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>148</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>152</b>

---

## Abkürzungen und Symbole

A	Ampère
Abb.	Abbildung
AcCoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	Adenylate energy charge (Energieladung der Zelle)
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
AUFS	Absorption unit full scale
BCA	Bicinchoninic acid
BHK	Baby Hamster Kidney, Zelllinie aus Goldhamsterovarien
bp	base pairs (Basenpaare)
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserum Albumin)
°C	Grad Celsius
cDNA	copy DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary, Zelllinie aus dem Ovar des chinesischen Hamsters
CIP	Calf intestine phosphatase (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
CS	Citrat-Synthase
CTP	Cytidintriphosphat
D	Verdünnungsrate
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxy Ribonucleic Acid (Deoxyribonucleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzolsäure
DTT	DL-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamine tetra acetic acid
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fetal calf serum (fötales Kälberserum)
Frc-6-P	Fructose-6-phosphat
g	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gln	Glutamin
GTP	Guanosintriphosphat
Ham's F12	F12 Medienmischung nach Ham

---

HEBS	Hepes buffered saline
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2- (ethanesulfonic acid)
HPAEC-PAD	High performance anion exchange chromatography - pulsed amperometric detection
HPLC	High performance liquid chromatography
hu	Human
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IF	Medienmischung aus Ham's F12 und Iscove's MEM, Verhältnis 1:1
IgG	Immunglobulin G
IP-RP	Ion-Pair-Reversed-Phase
IRES	Internal ribosomal entry site
kat	Katal
K <sub>m</sub>	Michaelis-Konstante
Lac	Lactat
LDH	Lactat-Dehydrogenase
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MALDI	Matrix-assisted laser desorption ionization
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMR	Nuclear magnetic resonance
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
μ	Teilungsrate
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Pyruvat-Carboxylase (mitochondriale Form)
PCA	Perchloric acid
PCR	Polymerase chain reaction
PDHC	Pyruvate dehydrogenase complex
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionaktivität in wässrigen Lösungen
PNGase	Peptid-N <sup>4</sup> -(N-Acetyl-β-glucosaminy)-asparagin-Amidase
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PPC	Pentosephosphatcyclus
PYC	Yeast pyruvate carboxylase (Hefe-Pyruvat-Carboxylase)
rhEPO	Recombinantes humanes Erythropoetin
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sf21	<i>Spodoptera frugiperda</i> , Insektenzelllinie
SMIF	Scharfenberg's modifiziertes IF Medium
SSC	(Sodiumchloride, Sodiumcitrate) buffer
SSPE	(Sodiumchloride, Sodiumphosphate, EDTA) buffer
SV	Simian Virus
Tab.	Tabelle
TBA	Tetrabutylammonium Hydrogensulfat
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris mit EDTA
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylendiamin

---

TOF	Time-of-flight
tPA	Gewebeplasminogenaktivator (tissue-plasminogen activator)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton-X	t-Octylphenoxypoly-ethoxyethanol
tRNA	transfer RNA
Tween20	Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate
UDP	Uridindiphosphat
UDP-GalNAc	UDP-N-Acetyl-Galactosamin
UDP-GlcNAc	UDP-N-Acetyl-Glucosamin
UDPGNAc	Summe aus UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
v/v %	Volumenprozent
W	Watt
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen (g l <sup>-1</sup> ))
Zellspez.	Zellspezifische
ZKT	Zellkulturtechnik

### Dezimale Teile von SI-Einheiten

G	Giga	10 <sup>9</sup>
M	Mega	10 <sup>6</sup>
k	Kilo	10 <sup>3</sup>
c	Zenti	10 <sup>-2</sup>
m	Milli	10 <sup>-3</sup>
μ	Mikro	10 <sup>-4</sup>
n	Nano	10 <sup>-5</sup>
p	Piko	10 <sup>-12</sup>
f	Femto	10 <sup>-15</sup>
a	Atto	10 <sup>-18</sup>

### Einheiten, die gemeinsam mit dem Internationalen Einheitensystem benutzt werden

min	Minute	= 60 s
h	Stunde	= 3600 s
d	Tag	= 86400 s
kat	katal	= Umsatz von 1 mol s <sup>-1</sup> Substrat unter definierten Reaktionsbedingungen
l	Liter	= 1 dm <sup>3</sup> = 10 <sup>-3</sup> m <sup>3</sup>
bp	base pair	= 1 Basenpaar
kb	Kilobasen	= 1000 Basen

---

# 1 Einleitung

Die Produktion von vielen biologisch hochwirksamen Proteinen wie z.B. Vakzine, Serumproteine, Hormone und Immundiagnostika erfolgt in tierischen Zellkulturen. Obwohl die äußeren Parameter zur Produktion dieser Proteine wie die Reaktorsysteme und Medien weitestgehend optimiert sind, ist das Produktionsvehikel selbst, die Zelle, noch wenig untersucht und optimiert. Für eine zielgerichtete Verbesserung der Produktionsbedingungen ist eine eingehende Untersuchung des Primärstoffwechsels notwendig.

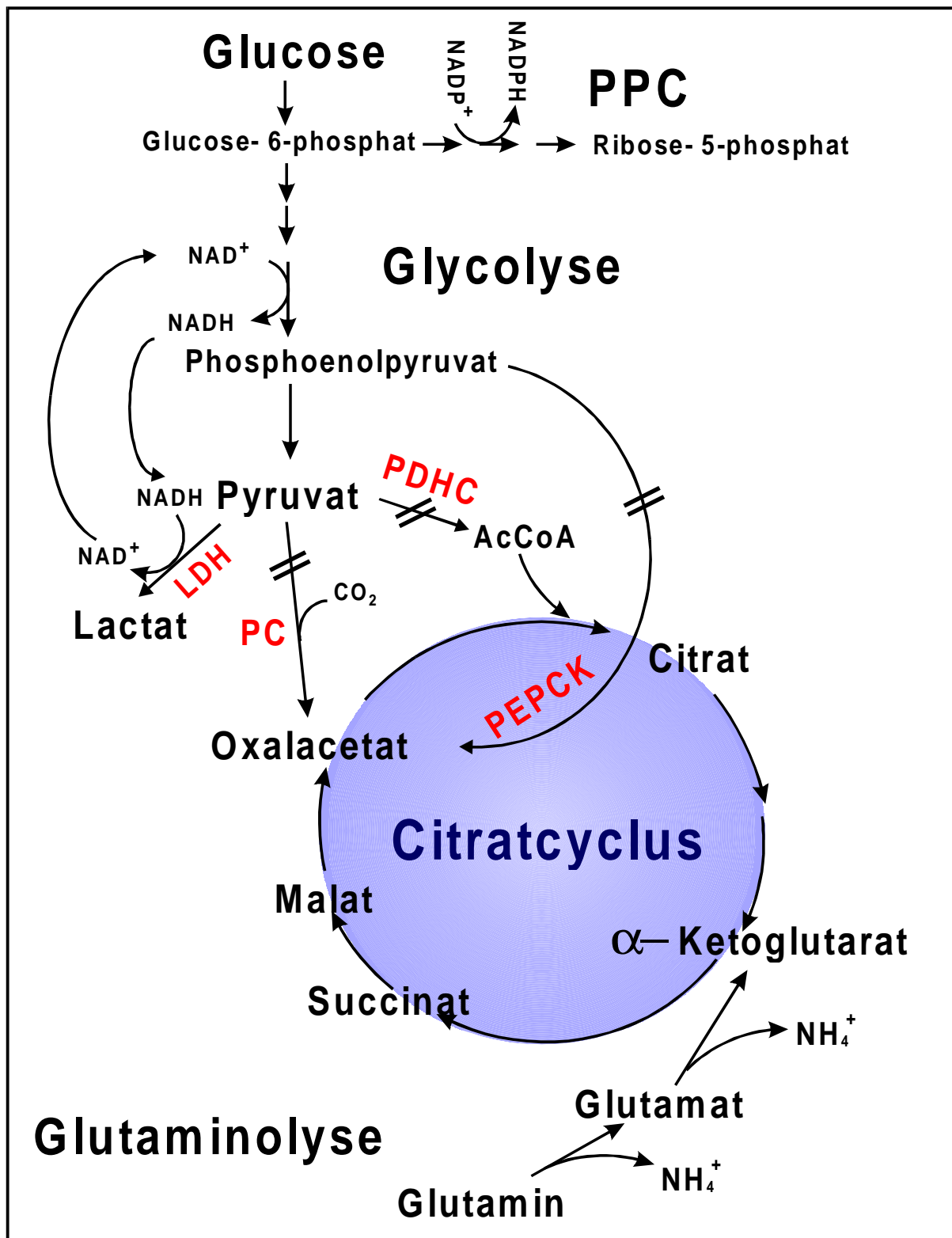
## 1.1 Primärstoffwechsel von kontinuierlichen Säugerzellen

Der Primärstoffwechsel von kontinuierlichen Zelllinien unterscheidet sich in einigen Punkten deutlich von der intakter primärer Zellen. Es ist lange bekannt, daß Zellkulturen einen hohen Bedarf an Glucose und, im Gegensatz zu primären Zellen, auch an Glutamin haben. Weiterhin kommt es bei der Kultivierung von tierischen Zellen zur Freisetzung großer Mengen von Lactat und Ammonium, die als Abfallprodukte in das Zellkulturmedium freigesetzt werden. Die Akkumulation dieser Abfallprodukte im Medium beeinträchtigt sowohl das Zellwachstum und die Vitalität als auch die Produktqualität. Durch das Ausscheiden unvollständig oxidierte Intermediate kommt es zu einer äußerst ineffizienten Nutzung der Energiequellen und damit zu einem hohen Bedarf an Substraten. Im folgenden sollen die wichtigsten Stoffwechselwege von Zelllinien erläutert und mit primären Zellen verglichen werden. Die Identifizierung entscheidender Lücken soll anschließend zur Formulierung einer geeigneten *Metabolic Engineering*-Strategie führen, die zur Optimierung des zellulären Stoffwechsels beiträgt.



### 1.1.1 Glucosestoffwechsel - Glycolyse und Pentosephosphat Shunt

Glucose stellt eines der Hauptenergiequellen für tierische Zellen dar. In primären Zellen und Insektenzellen findet eine Oxidation der Glucose im Cytosol bis zum Pyruvat statt, das anschließend in den Mitochondrien vollständig zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  oxidiert wird. In Zelllinien werden 95 bis 99,8 % der konsumierten Glucose zu Lactat und Alanin verstoffwechselt und anschließend ausgeschieden (Lanks et al., 1988, Fitzpatrick et al., 1993, Glacken et al., 1988, Petch und Butler, 1994). Die Verbrennung von Glucose über die aerobe Glycolyse ist eine Eigenschaft, den kontinuierliche Zelllinien mit vielen tumorigenen Zellen gemeinsam haben (Boxer und Devlin, 1961, Dietzen und Davis, 1993, McKeehan, 1982). Die übermäßige Lactatproduktion, die zu einer Ansäuerung des Kulturmediums führt, inhibiert das Wachstum (Ozturk und Palsson, 1991, Lao und Toth, 1997, Omasa et al., 1992, Goergen et al., 1994, Lanks, 1987) und die Produktivität der Zellen, obwohl das Ausmaß der Beeinträchtigung von der Zelllinie und der Lactatkonzentration abhängig zu sein scheint (Ozturk et al., 1992, Hassell et al., 1991). Obwohl das Phänomen der aeroben Glycolyse bereits in den 30er Jahren als ein Charakteristikum von Tumorzellen entdeckt wurde (Warburg, 1930), existiert noch keine eindeutige Erklärung für diese Erscheinung. Untersuchungen haben gezeigt, daß der Übergang der glycolytischen Intermediate in den Citratcyclus aufgrund fehlender Aktivität der entsprechenden Verbindungsenzyme Pyruvatdehydrogenase-Komplex (PDHC), Pyruvat-Carboxylase (PC) und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) unterbunden ist (Fitzpatrick et al., 1993, Neermann und Wagner, 1996, Petch und Butler, 1994, Vriezen und Van Dijken, 1998) (s. Abb. 1.1.1). Fitzpatrick et al. (1993) führen dies auf eine zu niedrige Expressionsrate der entsprechenden Enzyme zurück, während andere Autoren die Änderung der Enzymaktivitäten aufgrund irreversibler Phosphorylierungen durch bestimmte von Onkogenen codierte Proteinkinasen befürworten (Fiechter und Gmünder, 1989, Murray et al., 1992, Randle et al., 1984). In primären Zellen wird Pyruvat vom PDHC zu Acetyl-CoA decarboxyliert, das anschließend mit Oxalacetat zu Citrat kondensiert wird. Damit wird der erste Schritt des Citratcyclus eingeleitet. In einer weiteren Reaktion wandelt die Pyruvat-Carboxylase einen Teil des gebildeten Pyruvats



**Abb. 1.1.1** Darstellung einiger wichtiger Stoffwechselwege von Glucose und Glutamin. Glucose wird zunächst glycolytisch zu Pyruvat abgebaut. Dessen Überführung in den Citratcyclus ist jedoch in Zelllinien sehr schwach, da die verantwortlichen Enzyme Pyruvat-Dehydrogenase-Complex (PDHC) und Pyruvat-Carboxylase (PC) sowie die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) kaum aktiv sind.

zu Oxalacetat um und füllt somit den Citratcyclus immer wieder mit neuen Intermediaten auf (anaplerotische Reaktion). Diese Reaktion ist ebenso wichtig wie die Einführung des Pyruvats in den Citratcyclus, da aus dem Pool der Citratcyclusintermediate ständig Moleküle für den Aufbau von Aminosäuren und Porphyrinen abgeführt werden.

Die Blockade der enzymatischen Verbindung zum Citratcyclus führt zu einer Anhäufung des Pyruvats. Zur Regeneration des Wasserstoffakzeptors  $\text{NAD}^+$  im Cytosol wird Pyruvat in Lactat umgewandelt, so daß der glycolytische Fluß nicht zum Stillstand kommt (Lanks, 1986). Das erklärt die hohe Lactatfreisetzung und die hohe Lactat-Dehydrogenase (LDH) Aktivität in tierischen Zelllinien. Der Grund für den Verbleib des glycolytisch erzeugten  $\text{NADH}$  im Cytosol, trotz eines hohen  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  Verhältnisses, erklären Boxer und Devlin (1961) sowie Perez-Rodriguez et al. (1987) mit einem Defekt des Malat-Aspartat Shuttle Transporters, der in intakten Zellen für den Transport des  $\text{NADH}$  in die Mitochondrien zur oxidativen Phosphorylierung sorgt. Die Meinungen zu diesem Thema sind jedoch kontrovers. Während viele Autoren die *in vitro* Aktivität des Shuttles durch verschiedene Methoden und mit Hilfe von unterschiedlichen Inhibitoren demonstrieren konnten (Robinson und Halperin, 1970, López-Alarcón und Eboli, 1986, Greenhouse und Lehninger, 1976, Cederbaum und Rubin, 1976, Chiaretti et al., 1979), scheint die *in vivo*-Aktivität dieses Shuttles für die volle Funktionstüchtigkeit nicht auszureichen (Kovacevic, 1972). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte das Fehlen von ausreichenden Mengen an Citratcyclus-Intermediaten in kontinuierlichen Zellen sein, so daß ein konstanter Shuttleflux nicht aufrecht erhalten werden kann. Kovacevic (1972) konnte zeigen, daß die Verfügbarkeit von Aspartat den limitierenden Faktor für die Malat-Aspartat Shuttle-Funktion in Ehrlich Ascites Tumorzellen darstellt. Mitochondrien, die in Glucose und Glutamin inkubiert wurden, zeigten eine ausgeprägte Lactatproduktion, da Glucose eine Aspartatanreicherung verhindert. Die Zugabe von Glucose zu Mitochondrien, die zuvor 60 Minuten lang ausschließlich in Glutamin präinkubiert wurden und dadurch größere Mengen Aspartat gebildet hatten, unterband dagegen die Lactatproduktion solange, bis das Aspartat durch eine allmähliche Nutzung im Citratcyclus aufgebraucht war.

Der Abbau von Glucose durch die Glycolyse ist wegen des oben beschriebenen

Verlustes von NADH und Pyruvat für die Energiegewinnung sehr ineffizient. Es werden dabei nur 2 ATP gegenüber 36 ATP bei der vollständigen Oxidation erzeugt (Stryer, 1990). Tatsächlich konnte Neermann (1996) zeigen, daß der Fluß von Glucose in den Citratcyclus in einer BHK-21 Zelllinie weniger als 0,64 % des gesamten glycolytischen Fluxes beträgt. Somit erfolgt ein Großteil der Glucoseverwertung durch die Glycolyse.

Glucose wird in den Zellen neben der Energiegewinnung auch zur Synthese von Zellbausteinen benötigt. Dazu wird ein kleiner Teil der Glucose in den Pentosephosphatweg zu Ribose-5-phosphat und NADPH umgebaut. Während Ribose-5-phosphat für den Aufbau von RNA und DNA benötigt wird (Stryer, 1990, Zielke et al., 1984, Reitzer et al., 1979 und 1980), dient NADPH als Cofaktor in reduktiven Biosynthesen. Der Flux von Glucose durch den Pentosephosphatweg hängt mit der Glucosekonzentration und dem glycolytischem Flux zusammen (Glacken, 1988, Reitzer et al., 1979). Bei einer Erhöhung des glycolytischen Fluxes wird eine Verringerung des Flusses in den Pentosephosphatweg beobachtet und auch umgekehrt (Zielke et al., 1978, Glacken, 1988, Reitzer et al., 1979).

### **1.1.2 Glutaminolyse - Die Energie- und Ammoniumquelle**

Der glycolytische Abbau von Glucose kann in tierischen Zellen nur einen geringen Teil des gesamten Energiebedarfs decken. Ein Großteil der Energie, zwischen 30 und 50 % und mehr als 98 % bei Fehlen von Glucose, werden aus der Glutaminoxidation, auch Glutaminolyse genannt, gewonnen (Reitzer et al., 1979, Zielke, 1976, 1978 und 1984, Donnelly und Scheffler, 1976). Dabei sind die Raten der aeroben Glycolyse und der Glutaminolyse stark miteinander verknüpft und hängen von der Verfügbarkeit der einzelnen Energiequellen ab (Zielke et al., 1978, Lanks, 1986, Kuchka, 1981). Bei hohen Glucosekonzentrationen wird der Anteil der Glutaminolyse an der Energiegewinnung der Zellen erniedrigt (Zielke et al., 1978, Reitzer et al., 1979, Kvamme und Svenneby, 1961). Der Abbau von Glutamin kann auf vielfältige Weise geschehen. Insgesamt wurden acht verschiedene Wege identifiziert (Häggström, 1991, Glacken, 1988, McKeehan, 1986), bei denen unterschiedliche Mengen an Ammonium und Energie gewonnen werden. Dazu wird das Glutamin zu  $\alpha$ -Ketoglutarat deaminiert

und in den Citratcyclus eingeleitet, wo es entweder vollständig zu  $\text{CO}_2$  und Wasser oxidiert wird (Glacken et al., 1988, Reitzer et al., 1979) oder in

**Tab. 1.1.2** Energiegewinn und Ammoniumfreisetzung aus verschiedenen Abbauwegen des Glutamins (Häggström, 1991, Glacken, 1988).

Endprodukte	ATP/Glutamin (mol/mol)	$\text{NH}_4^+$ /Glutamin (mol/mol)	ATP/ $\text{NH}_4^+$ (mol/mol)
$5 \text{ CO}_2 + 2 \text{ NH}_4^+$	27	2	13,5
$\text{Ala} + 2 \text{ CO}_2 + \text{NH}_4^+$	9	1	9
$\text{Ala} + 2 \text{ CO}_2$	9	0	$\infty$
$\text{Asp} + \text{CO}_2 + \text{NH}_4^+$	9	1	9
$\text{Lac} + 2 \text{ CO}_2 + 2 \text{ NH}_4^+$	9	2	4,5

unterschiedlichen Kombinationen aus den Endprodukten  $\text{CO}_2$ , Ammonium, Alanin, Aspartat und Lactat freigesetzt wird (s. Tab. 1.1.2). Bei einer vollständigen Oxidation werden pro Mol Glutamin zwei Mole Ammonium freigesetzt. Dabei ist der Energiegewinn mit 27 ATP am höchsten und das  $\text{ATP}/\text{NH}_4^+$  Verhältnis ebenfalls. Neben seiner Funktion als Energiequelle erfüllt das Glutamin eine weitere Funktion als essentielle Aminosäure und Stickstoffquelle der Zelle. Durch Deaminierungen gewonnenes Ammonium wird für die Synthese von Purinen, Pyrimidinen sowie N-acetylierten aktivierten Zuckermolekülen benötigt (Stryer, 1990, Zetterberg und Engstrom, 1981, McKeehan, 1982, Ryll, 1992). Überschüssiges Ammonium im Kulturmedium entsteht dabei nicht nur als Stoffwechselendprodukt, sondern auch aus dem spontanen, thermischen Zerfall von Glutamin im Zellkulturmedium (Tritsch und Moore, 1962, Negrotti et al., 1989). Das Glutamin hat dabei eine Halbwertszeit von 7 Tagen bei  $37^\circ\text{C}$  bzw. zerfällt zu 10 % pro Tag.

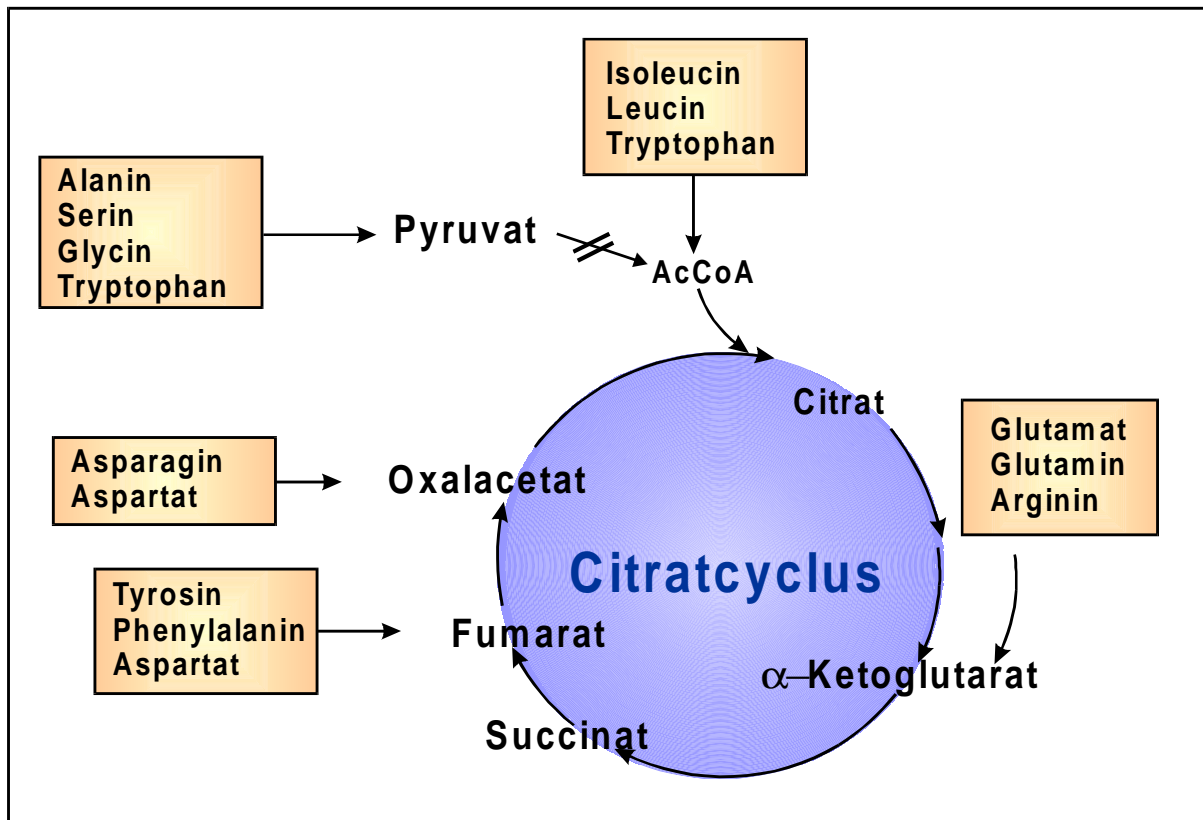
### 1.1.2.1 Ammonium als Zelltoxin

Die Freisetzung von Ammonium aus der Glutaminolyse hat einen inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum und führt bei höheren Konzentrationen zum Zelltod (Butler und Spier, 1984, Butler et al., 1983, Reuveny et al., 1986a, Kimura et al., 1987, Miller et al., 1988a, Newland et al., 1990, Glacken, 1988, Häggström et al., 1996, Lao und Toth, 1997). Obwohl der Mechanismus der Toxizität noch nicht völlig aufgeklärt ist, gibt es verschiedene Ansätze und Hypothesen. Einige Autoren postulieren, daß die Aufnahme des Ammoniums zu einer pH-Erhöhung innerhalb der Lysosomen führt (McQueen und Bailey, 1991, Wu et al., 1993, Cain und Murphy, 1986) bzw. eine pH Erniedrigung innerhalb des Cytoplasmas bewirkt (Ozturk et al., 1992, McQueen und Bailey, 1991). Cherlet und Marc (1998) andererseits konnten keine Veränderung des intrazellulären pH bei einer Ammoniumapplikation feststellen. Martinelle et al. (1998) führen die Ammoniumtoxizität auf eine Ansäuerung des Cytoplasmas sowie eine Veränderung der Aktivität von bestimmten Ionentransportern zurück. Sie konnten zeigen, daß an dem Transport von Ammonium in die Zellen sowohl Diffusionsvorgänge als auch der aktive Transport durch einen  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Cotransporter beteiligt sind, der anstelle von  $\text{K}^+$ -Ionen ebenfalls Ammonium akzeptiert (Martinelle et al. 1998, Martinelle und Häggström, 1993, Martinelle et al., 1996). Zur Aufrechterhaltung der Ionengradienten entlang der Zellmembran ist eine erhöhte Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiports nötig, was mit einer deutlichen Zunahme der Erhaltungsenergie der Zelle einhergeht. Somit beruht die Toxizität des Ammoniums auf einem erhöhten Energiebedarf der Zellen sowie einer Erniedrigung des cytoplasmatischen pH-Wertes. Glacken (1988) und Glacken et al. (1988) postulieren die Existenz von energieverbrauchenden Zyklen, "Futile cycles", die keinen metabolischen Gewinn für die Zelle erzeugen. Doyle und Butler (1990) dagegen führen den toxischen Effekt des Ammoniums auf eine Inhibierung der Glutamat-Dehydrogenase zurück, der für die Bildung von  $\alpha$ -Ketoglutarat aus Glutamat verantwortlich ist. Dadurch kommt es zur Abnahme von Citratcyclus Intermediaten und des Citratcyclusfluxes. Eine gänzlich andere Betrachtungsweise haben Ryll (1992) und Ryll et al. (1994), die vermuten, daß das Ammonium als Baustein für die Synthese von UDP-aktivierten N-acetylierten Hexosaminen (UDPGNAc) dient. Eine Ammoniumapplikation führt somit zu einer

Veränderung der Nukleotidpools und einer Erhöhung des zellulären UDPGNAC-Gehaltes. Dieser Stoffwechselweg konnte später von Valley (1996) sowie Valley et al. (1999) durch die Verwendung von  $^{15}\text{N}$ -markiertem  $\text{NH}_4\text{Cl}$  verfolgt und bestätigt werden. Als wichtiger Baustein für die Glycosylierung entfaltet sich die toxische Wirkung des UDPGNAC durch die Veränderung der Glycosylierungsmuster einer Reihe von Enzymen und Zellproteinen (Valley et al., 1999, Gawlitzek et al., 1998, Grammatikos et al., 1998, Goochee und Monica, 1990). Eine hohe UDPGNAC Konzentration in den Zellen führt zu einer Inhibierung des CMP-NeuAc Transports in das Golgi Lumen (Pels Rijcken et al., 1995) und setzt somit den Sialylierungsgrad der Glycoproteine herab (Gawlitzek et al., 1998, Thorens und Vasalli, 1986). Damit einhergehend wird die biologische Funktionalität der Proteine verändert und beeinflusst.

### 1.1.3 Der Aminosäurestoffwechsel

Der Aminosäurestoffwechsel ist über die Intermediate des Citratcyclus eng mit dem Primärmetabolismus verknüpft. Die Aminosäuren dienen nicht nur als Bausteine für die Proteinbiosynthese, sondern können beim Abbau zur Energieerzeugung und Bildung von Citratcyclus Intermediaten dienen (s. Abb 1.1.3). In Zelllinien ist die Funktion der Aminosäuren als Energie- und Intermediatenlieferanten besonders ausgeprägt. So kann der Abbau von ketogenen Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin und Tryptophan zur Lieferung von Acetyl-CoA dienen und damit in Zelllinien die sehr schwache PDHC Reaktion (s. Abb. 1.1.1) unterstützen bzw. kompensieren (Stryer, 1990, Blaskovics et al., 1978, Oizumi et al., 1986). Ein Hinweis auf die energieliefernde Funktion dieser Aminosäuren ist die Tatsache, daß sie während der Kultivierung in weitaus größeren Mengen konsumiert werden als zur Synthese von Proteinen nötig ist (Wagner et al., 1988, Miller et al., 1987). Die Aminosäuren Alanin und Asparagin, die unter normalen Glutaminkonzentrationen ins Medium ausgeschieden werden, stehen bei Glutaminmangel wieder als Lactat bzw. Oxalacetat für die Energiegewinnung zur Verfügung (Wagner et al., 1988). Abb. 1.1.3 gibt einen guten Überblick über die Abbauprodukte einiger Aminosäuren.



**Abb. 1.1.3** Abbauprodukte einiger Aminosäuren. Die gebildeten Citratcyclus Intermediate können entweder zum Aufbau anderer Substanzen verwertet werden oder bei vollständiger Oxidation als Energielieferanten dienen.

## 1.2 Prozeßoptimierung durch Metabolic Control und Metabolic Design

Das Ziel der zellkulturtechnischen Produktion ist, die Zellfunktionen und damit verbunden die Produktivität und das Zellwachstum so lange wie möglich aufrecht zu erhalten. Die Erhaltung der Zellvitalität und Produktqualität ist jedoch zeitlich begrenzt. Mit zunehmender Kulturdauer verändern sich der intrazelluläre Zustand der Zelle und die Zusammensetzung des Mediums so sehr, daß die Produktqualität insbesondere die Glycosylierung geändert wird. Es gibt drei verschiedene Ansätze, qualitäts- und produktivitätssteigernde Bedingungen zu schaffen: i) Die Optimierung von Bioreaktoren, ii) Die Optimierung der Medien und Mediensupplemente, und iii) Die



---

Veränderung der Zellphysiologie durch permanente, intrazelluläre Eingriffe ("Metabolic Design" oder "Metabolic Engineering") und oder durch prozeßtechnische, extrazelluläre Einflußfaktoren ("Metabolic oder Catabolic Control").

Um die Verschlechterung der Kultivierungsbedingungen besser unter Kontrolle bringen zu können, werden Stoffflüsse gemessen oder mathematisch berechnet und modelliert (Xie und Wang, 1994a und 1994b, Liao und Delgado, 1993, Zeng und Deckwer, 1995, Linz et al., 1997, Glacken, 1989). Auf dieser Basis werden anschließend spezielle Medien konzipiert und Fütterungsstrategien entwickelt, so daß die Zellen zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung optimal mit Nährstoffen versorgt werden und außerdem die Ausscheidung von toxischen Nebenprodukten verringert wird. Diese Ansätze werden unter dem Begriff "Catabolic Control" zusammengefaßt. Ljunggren und Häggström (1994 und 1992) sowie Glacken et al. (1986) konnten durch den Einsatz von glutamin- bzw. glucose- und glutaminlimitierten fed-batch Kultivierungsmodi die Lactat-, Ammonium- und Alaninbildung auf vernachlässigbar kleine Raten herunterregeln, während gleichzeitig die Effektivität der Substratnutzung durch eine Erhöhung des vollständigen, oxidativen Substratabbaus deutlich gesteigert werden konnte. Andere Autoren entwickelten Systeme, um die von den Zellen sezernierten toxischen Beiprodukte aus dem Kulturmedium zu entfernen. So haben Chang et al. (1995a und 1995b) eine elektrokinetische Technik entwickelt, mit deren Hilfe sie Lactat und Ammonium aus dem Medium entfernen konnten. Auch andere Methoden wie Kationenaustauscher und Adsorptionssäulen kommen zum Einsatz (Capiaumont et al., 1995, Nayve Jr. et al., 1994). Eine sehr übersichtliche Zusammenfassung über die Einflüsse von Ammonium auf Zellkulturen und die verschiedenen Methoden zu deren Entfernung aus dem Kultursystem beitet das Review von Schneider et al. (1996).

Eine andere Möglichkeit, den Stoffwechsel der Zellen zu beeinflussen oder den Zellen eine erwünschte Eigenschaft zu verleihen, ist das Metabolic Design oder Metabolic Engineering (Stephanopoulos und Sinskey, 1993, Bailey, 1991, Stephanopoulos, 1994, Cameron und Tong, 1993, Nielsen, 1998). Hierbei wird die Zelle, der Ort des Stoffwechselvorganges, durch einen gezielten genetischen Eingriff modifiziert und damit verbessert. Es gibt eine Reihe von Metabolic Engineering-Beispielen für Mikroorganismen und Hefen (Ohta et al., 1991, Ingram et al., 1987, Rogers und

Szostak, 1987, Shiomi und Fukuda, 1992). Eine gerichtete Veränderung von Stoffwechselwegen in tierischen Zellen hat erst in den letzten Jahren an Popularität zugenommen. Unter den Ansätzen befinden sich beispielsweise die Verlängerung der Zellvitalität mittels eines Apoptose-Suppressor-Gens - bcl-2 - (Singh et al., 1996). Weitere Beispiele sind die Expression von Vitreoscilla Hämoglobin in einer CHO Zelllinie zur Steigerung der Produktivität (Pendse und Bailey, 1994), die Expression von Cyclin E (Renner et al., 1995) oder des Transkriptionsfaktors E2F-1 zur Befähigung von Wachstum in proteinfreiem Medium (Lee et al., 1996) sowie eine Reihe weiterer Versuche. Trotz vieler Ansätze zur Verbesserung der Produktivität, des Wachstums oder der Produktqualität (Schlenke et al., 1998, Lee et al., 1989), gibt es kaum Beispiele zur Manipulation des primären Stoffwechsels. Es wird angenommen, daß das Netzwerk der Reaktionen im primären Stoffwechsel sehr komplex und daher kaum beeinflussbar ist (Stephanopoulos und Vallino, 1991). Unter den wenigen Beispielen befinden sich die Klonierung der Glutaminsynthetase (Bell et al., 1995, Birch et al., 1994) sowie des gesamten Threonin-Syntheseweges (Rees et al., 1995). Die Autoren bezweckten damit ein Wachstum ohne den Zusatz dieser essentiellen Aminosäuren. Das Entfernen des Glutamins vom Nährmedium senkt die Medienkosten, und vor allem behebt er die Probleme der Ammoniumtoxizität. Jedoch ist der Bedarf an Glutamin in kontinuierlichen Zellen allein zur Energiegewinnung so enorm, daß das Weglassen des Glutamins in dem Kulturmedium das Wachstum und die Produktivität der Zellen deutlich beeinträchtigt und somit dieser Weg für die industrielle Produktion von rekombinanten Proteinen weniger interessant erscheint. Neermann (1996) hat erstmals eine Manipulation des Glucosestoffwechsels vorgenommen. Durch eingehende Untersuchungen des Glucose- und Glutaminmetabolismus mit Hilfe von Enzymaktivitätsbestimmungen sowie Fluxanalysen von Metaboliten in verschiedenen Stoffwechselwegen konnte er das Eingangsenzym der Glycolyse, die Hexokinase, als den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glycolyse identifizieren. Die Klonierung des Gens für die Rattenhirn-Hexokinase I in eine BHK Zelllinie bewirkte eine Erhöhung des glycolytischen Fluxes und eine nahezu Verdreifachung des intrazellulären ATP Gehaltes. Damit einhergehend nahm das Wachstum ab und die Lactatproduktionsrate zu. Die Abnahme des Wachstums wurde dabei vermutlich durch eine Abnahme des Pentosephosphat Fluxes bewirkt, die mit einer Erhöhung des glycolytischen Fluxes

gekoppelt ist (Reitzer et al., 1979 und 1980, Zielke et al., 1978). Die Erhöhung der Lactatbildungsrate war ebenfalls eine direkte Folge des erhöhten glycolytischen Fluxes. Wie Neermann zeigen konnte, ist die enzymatische Überführung von Pyruvat in den Citratcyclus aufgrund fehlender Aktivität entsprechender Enzyme nahezu unterbunden. Aus diesem Grund konnte zusätzliche Glucose, die glycolytisch metabolisiert wurde, nur in Lactat umgebildet werden. Weiterhin führte die Zunahme des zellulären ATP Gehaltes zu einer deutlichen Erhöhung der Produktionsrate eines rekombinanten Modellproteins, der  $\beta$ -Galactosidase.

Diese Untersuchungen zeigten, daß eine erfolgreiche Umleitung der Stoffflüsse und eine Verbesserung des Stoffwechsels durch Metabolic Engineering Ansätze durchaus möglich sind. Für die Verbesserung der Energieausbeute und die Verminderung der Nebenproduktbildung sollte nunmehr ein neues Konzept angewandt werden, bei der es zu einer übergreifenden Verbesserung des Energiemetabolismus kommen würde. Aus den zuvor erläuterten Erkenntnissen leitete sich die Wiederherstellung einer enzymatischen Verbindung zwischen der Glycolyse und dem Citratcyclus als eine gute Möglichkeit zur Verbesserung des Stoffwechsels dar (Irani et al., 1999).

### **1.3 Strategie zur Einführung einer rekombinanten Pyruvat-Carboxylase zur Optimierung des Energiemetabolismus**

Die Überführung der Endprodukte der Glycolyse in den Citratcyclus kann enzymatisch auf drei verschiedenen Wegen erfolgen wie aus Abb. 1.1.1 ersichtlich wird. Der in primären Zellen übliche Weg ist die Decarboxylierung durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDHC). Die Klonierung dieses Enzymkomplexes zur Wiederherstellung des Fluxes in den Citratcyclus wurde als wenig sinnvoll erachtet, da dieses Enzymkomplex sich aus drei verschiedenen Enzymen und 60 verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt (Reed et al., 1985). Das würde die Transfektion einer großen Anzahl von Genen bedeuten, was den Transfektionserfolg deutlich

---

herabsetzen würde. Ein weiterer Hinderungsgrund ist die Tatsache, daß der PDHC mitochondrial lokalisiert ist. Bei einer Expression des Gens im Zellkern ist die Fusion einer zusätzlichen Signalsequenz notwendig, die für den Transport dieses Enzyms in die Mitochondrien sorgt. Damit wäre die Klonierung deutlich erschwert und die erfolgreiche Expression dennoch fragwürdig. Ein weiteres Enzym, das die Überleitung der Glycolyse zum Citratcyclus schafft, ist die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK). Die Funktion dieses Enzyms im normalen Organismus ist die Überführung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat und anschließend zu Glycogen. Sie erfüllt hauptsächlich anaplerotische Funktionen und ist aus diesem Grund für den umgekehrten Weg weniger geeignet. Die Pyruvat-Carboxylase erfüllt mit der Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat sowohl katabolische als auch anabolische (Marco und Sols, 1969) Funktionen. Wird das Oxalacetat in den Citratcyclus eingeschleust, geht das Oxalacetat den katabolischen Abbauweg. Wird das Oxalacetat in Malat und Phosphoenolpyruvat umgewandelt, wird der gluconeogenetische Weg beschritten (Marco und Sols, 1969, Yarmush und Berthiaume, 1997). Die Problematik der mitochondrialen Lokalisation kann bei der Pyruvat-Carboxylase umgangen werden, da es in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eine cytosolische Form dieses Enzyms gibt (PYC). Die Expression dieses Enzyms im Cytosol führt zu einer Umwandlung des Pyruvat in Oxalacetat und anschließend von der cytosolischen Malat-Dehydrogenase in Malat (s. Abb. 1.3). Dieses kann durch den Malat-Aspartat Shuttle in die Mitochondrien und damit in den Citratcyclus eingeschleust werden. Damit kann erreicht werden, daß das glycolytisch erzeugte Pyruvat in den Citratcyclus gelangt. Außerdem kann das cytosolische NADH durch die Übertragung des Wasserstoffs auf das Oxalacetat ebenfalls indirekt in die Mitochondrien transferiert werden. Auf diese Weise kann cytosolisches NAD<sup>+</sup> regeneriert werden, und es bleiben weniger Substrat und Cofaktor für die Lactat-Dehydrogenase Reaktion. Benötigtes Acetyl-CoA, das nicht aus der Pyruvat-Dehydrogenase Reaktion geliefert werden kann, wird in den Mitochondrien aus der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren oder dem Abbau von ketogenen Aminosäuren zur Verfügung gestellt. Hierbei ist es wichtig anzumerken, daß die cytosolisch exprimierte Hefe-Pyruvat-Carboxylase im Gegensatz zu der mitochondrialen Form auch ohne den Aktivator Acetyl-CoA aktiv ist (Osmani et al., 1985, Utter et al., 1975, Wood und Barden, 1977).

---

Die Einführung der PYC2 ermöglicht zusätzlich zur Ingangsetzung des Citratcyclus die Schaffung eines NADPH-produzierenden Cyclus'. Pyruvat wird nach der Überführung in Oxalacetat und Malat wieder in Pyruvat zurückgewandelt. Das Malatenzym, das Malat in Pyruvat überführt, erzeugt dabei NADPH, das für reduktive Biosyntheseprozesse in der Zelle benötigt wird (MacDonald, 1995). Auf diese Weise kann der Pentosephosphatweg unterstützt werden. Die Strategie zur Verbesserung des Primärstoffwechsels mit Hilfe der cytosolischen Pyruvat-Carboxylase wurde im Jahre 1998 patentiert (Wagner et al., 1998).

Die Wahl eines Pyruvat-Carboxylase Enzyms aus einer anderen Spezies sowie dessen Expression im Cytosol können einen reinen Enzymdosiseffekt vermeiden. Außerdem wird auf diese Weise ein völlig neuer Stoffwechselweg geschaffen, bei dem der zu erzielende Erfolg höher zu erwarten sein dürfte als die Steigerung der Enzymmenge für einen bestehenden Stoffwechselweg.

Eine Defizienz von Pyruvat-Carboxylase Aktivität ist auch im Menschen beobachtet worden und wird als Lacticacidose bezeichnet (Robinson, 1989, Oizumi et al., 1986). Es handelt sich dabei um einen monogenetisch vererbten Pyruvat-Carboxylase Defekt, der sich durch hohe Blutlactatkonzentrationen bemerkbar macht und bei fehlender Behandlung zunächst zu Schwachsinn und frühzeitigem Tod führt. Die Einführung des Pyruvat-Carboxylase Gens könnte als Gentherapie für solche Patienten dienen. Für eine erfolgreiche Therapie wäre der Einsatz von humaner, mitochondrial lokalisierter Pyruvat-Carboxylase (MacKay et al., 1994, Freytag und Collier, 1984) von Vorteil.

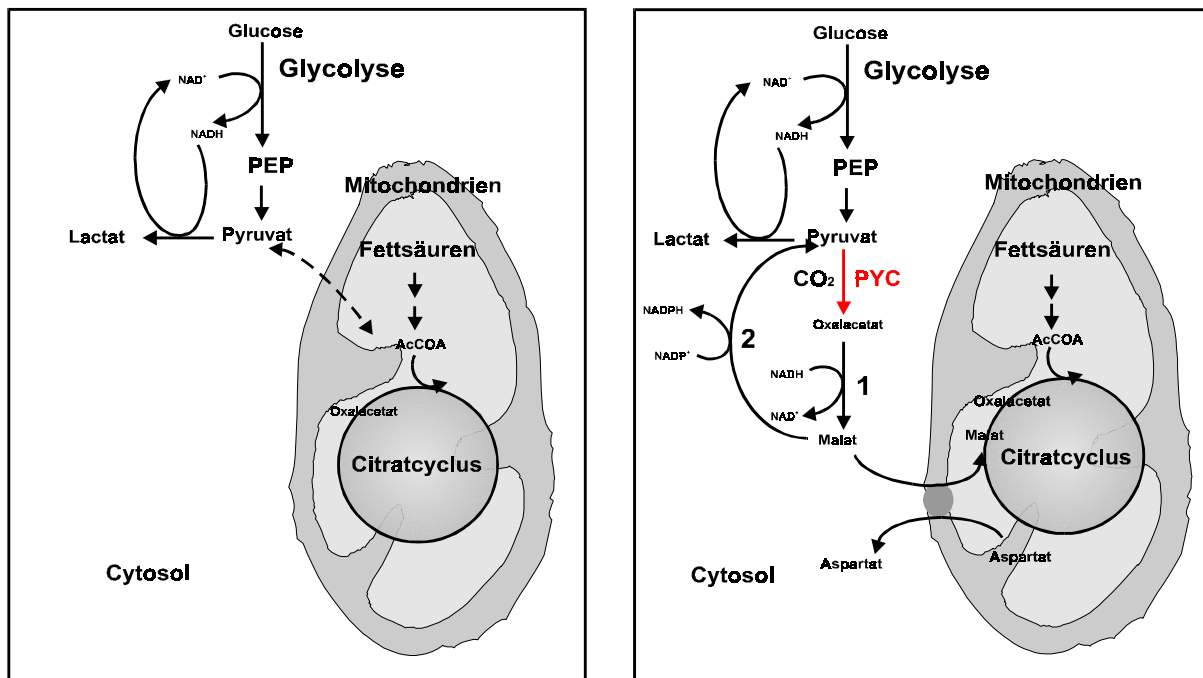


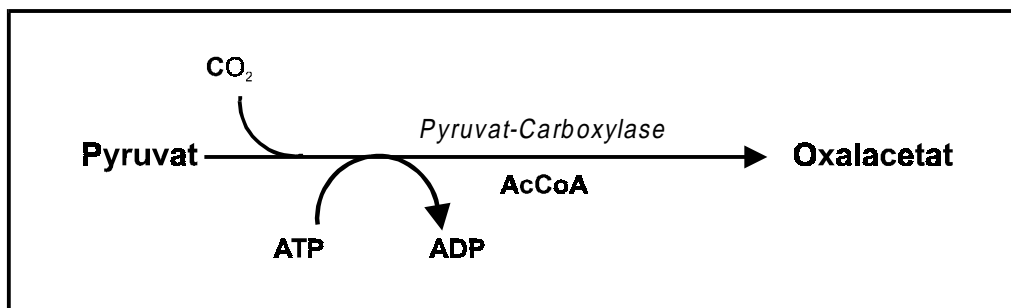
Abb. 1.3

**Links:** Darstellung der Stoffflüsse in kontinuierlichen Zelllinien. Eine Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA findet kaum statt. Pyruvat wird größtenteils zur Regeneration von cytosolischem  $\text{NAD}^+$  in Lactat umgewandelt. **Rechts:** Pyruvat wird im Cytosol durch die Hefe-Pyruvat-Carboxylase (PYC2) in Oxalacetat umgewandelt, welches von der cytosolischen Malat-Dehydrogenase in Malat umgewandelt wird. Bei dieser Reaktion wird  $\text{NADH}$  aufgebraucht. Das entstehende Malat wird über den Malat-Aspartat Shuttle in die Mitochondrien und den Citratcyclus eingeschleust. Durch die Verwendung von  $\text{NADH}$  und Pyruvat stehen der LDH-Konkurrenzreaktion weniger Substrate zur Verfügung. Bei der Rückumwandlung von Malat zu Oxalacetat wird  $\text{NADH}$  wieder freigesetzt. Notwendiges Acetyl-CoA für die Synthese von Citrat aus Oxalacetat, das kaum durch die Pyruvat-Dehydrogenase Reaktion entsteht, wird durch die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren geliefert. Die Rückreaktion von überschüssigem Malat zu Pyruvat im Cytosol kann als ein  $\text{NADPH}$ -produzierender Cyclus dienen, bei der unter Aufwendung eines ATP und  $\text{NADH}$  ein  $\text{NADPH}$  gewonnen werden kann. 1: Cytosolische Malat-Dehydrogenase; 2: Malat-Enzym.

## 1.4 Eigenschaften und Isoenzyme der Hefe-Pyruvat-Carboxylase

Die Pyruvat-Carboxylase ist ein ubiquitäres Enzym. Es gibt einige Unterschiede zwischen den Formen, die in den verschiedenen Spezies vorkommen, doch gibt es eine Reihe von Eigenschaften, die identisch sind. Die Pyruvat-Carboxylase ist ein tetrameres Enzym aus vier identischen biotinylierten Untereinheiten (Osmani et al.,

1985, Goss et al., 1979). Die Größe jeder Untereinheit in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beträgt etwa 120.000 bis 125.000 Da (Utter et al., 1975, Brewster et al., 1994). Während die Pyruvat-Carboxylase in allen Mammaliazellen mitochondrial lokalisiert ist, befindet sich die Hefe-Pyruvat-Carboxylase im Cytosol (Osmani et al., 1985, Walker et al., 1991, Rohde et al., 1991) (s. Tab. 1.5). Abbildung 1.5 zeigt die von der Pyruvat-Carboxylase katalysierte Reaktion.



**Abb. 1.4** Schema der Pyruvat-Carboxylase Reaktion. Bildung von Oxalacetat aus Pyruvat. Acetyl-CoA dient als Aktivator.

*Saccharomyces cerevisiae* verfügt über zwei verschiedene Isoenzyme der Pyruvat-Carboxylase, PYC1 und PYC2 (Brewster et al., 1994, Stuka et al., 1991, s. Tab. 3). Im Hefeorganismus erfüllt PYC1 eine hauptsächlich anaplerotische Rolle, indem sie das fermentative und gluconeogenetische Wachstum unterstützt. Die Funktion von PYC2 dagegen in Hefe ist nicht deutlich. Es wird jedoch vermutet, daß sie für das Wachstum mit einer glycolytisch abbaubaren Substratquelle notwendig ist (Brewster et al., 1994). Weitere wichtige Unterschiede zwischen diesen zwei Isoformen sind die  $K_m$  Werte für das Substrat Pyruvat. Die Affinität des PYC2 für Pyruvat ist mit einem  $K_m$  Wert von 0,31 mM (Stucka et al., 1991) deutlich höher als die des PYC1 mit einem  $K_m$  von 0,8 mM (Ruiz-Amil et al., 1965, Scrutton et al., 1969). Die Wahl des Isoenzym sollte so erfolgen, daß seine Affinität zum Pyruvat möglichst groß ist, um so mit der Lactat-Dehydrogenase, die das gleiche Substrat verwendet, konkurrieren zu können. Die Funktion des PYC2 in der Hefe sowie ihr niedriger  $K_m$ -Wert für Pyruvat sprechen für

die Verwendung der PYC2 für den geplanten Metabolic Engineering Versuch.

**Tab. 1.4** Gegenüberstellung einiger Eigenschaften der Mammalia und Hefe-Pyruvat-Carboxylasen. (1: Utter et al., 1975; 2: Osmani et al., 1985; 3: Hühnchen-PC, Mildvan et al., 1966; 4: Barden und Scrutton, 1974; 5: Scrutton et al., 1969; 6: Keech und Utter, 1963; 7: Wood und Barden, 1977; 8: Cazzulo und Stoppani, 1967; 9: Stucka et al., 1991; 10: Ruiz-Amil et al., 1965).

	<b>Mammalia-PC</b>	<b>PYC1</b>	<b>PYC2</b>
<b>Molekulargewicht pro Untereinheit (Da)</b>	120.000-130.000 <sup>1</sup>	120.000-125.000 <sup>1</sup>	120.000-125.000 <sup>1</sup>
<b>zelluläre Lokalisation</b>	Mitochondrien <sup>1</sup>	Cytosol <sup>1</sup>	Cytosol <sup>1</sup>
<b>K<sub>m</sub> für Pyruvat (mM)</b>	0,44 <sup>1,3,4,5,6</sup>	0,8 <sup>10</sup> / 0,45 <sup>9</sup>	0.31 <sup>9</sup>
<b>Aktivatoren</b>	Acetyl-CoA (K <sub>A</sub> =2 µM) <sup>1</sup> Propionyl-CoA (K <sub>A</sub> =14 µM) <sup>1</sup> n-Butyryl-CoA (K <sub>A</sub> =75 µM) <sup>1</sup>	Acetyl-CoA (K <sub>A</sub> =92 µM) <sup>1</sup> und langkettige Co-A Derivate wie Palmitoyl-CoA (K <sub>A</sub> =0,2 µM) <sup>1</sup> Stearoyl-CoA (K <sub>A</sub> =0,7 µM) <sup>1</sup> u.a	Acetyl-CoA (K <sub>A</sub> =92 µM) <sup>1</sup> und langkettige Co-A Derivate wie Palmitoyl-CoA (K <sub>A</sub> =0,2 µM) <sup>1</sup> Stearoyl-CoA (K <sub>A</sub> =0,7 µM) <sup>1</sup> u.a
<b>Aktivität ohne Aktivator</b>	keine Aktivität <sup>1,2</sup>	aktiv <sup>1,2,7</sup>	aktiv <sup>1,2,7</sup>
<b>Inhibitoren</b>	Avidin L-Glutamat <sup>2</sup> α-Ketoglutarat <sup>2</sup>	Avidin L-Aspartat <sup>2,8</sup> β-Ketoglutarat <sup>2</sup>	Avidin L-Aspartat <sup>2,8</sup> β-Ketoglutarat <sup>2</sup>



## 1.5 Problemstellung und Zielsetzung

Der Verbesserung der Erträge und Wirtschaftlichkeit der tierischen Zellkultivierung sind durch die Ineffektivität des Zellmetabolismus Grenzen gesetzt. Große Fortschritte konnten bereits mit der Reaktor- und Prozeßoptimierung erzielt werden. Weitere Forschung über die Zelle und den Zellmetabolismus sind nötig, um die Ursache der Probleme zu verstehen und zu beseitigen. Erste Untersuchungen des Primärstoffwechsels haben gezeigt, daß in kontinuierlichen Zelllinien eine Überführung der Glycolyse-Endprodukte in den Citratcyclus aufgrund mangelnder Aktivität beteiligter Enzyme unterbunden ist. Die Klonierung eines Hefe-Pyruvat-Carboxylase Gens in eine BHK-Zelllinie soll im Rahmen dieser Arbeit zeigen, ob eine Wiederherstellung dieser enzymatischen Verbindung und damit eine Erhöhung des Glucoseflusses in den Citratcyclus möglich ist. Zunächst soll die erfolgreiche Expression der Pyruvat-Carboxylase gezeigt und anschließend der Einfluß auf den Zellmetabolismus charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist eine Reduktion der Substratverbrauchsraten möglich?
2. Wird die Produktion der toxischen Nebenprodukte Lactat und Ammonium verringert?
3. Kann die Lebensdauer einer Kultur durch bessere Substratnutzung verlängert werden?
4. Führt eine bessere Substratnutzung zu einem erhöhten intrazellulären Energie- und ATP Level?
5. Kann die Zellwachstumsrate oder die maximal erreichbare Zellkonzentration erhöht werden?

Schließlich soll die Produktionskapazität der metabolisch veränderten Zellen anhand von EPO als Modellglycoprotein untersucht werden. In diesem Zusammenhang soll die Produktintegrität und das Vorhandensein von N- und O-Glycosylierungen durch die Western Blot Analyse von PNGase verdautem und unverdautem Protein gezeigt werden. Weiterhin stellt sich die Frage, ob eine bessere Substratnutzung zu höheren

Erträgen und höheren Produktkonzentrationen in der Ernte führt.

Mit Hilfe dieses Metabolic Engineering Ansatzes soll gezeigt werden, ob eine Veränderung des primären Energiestoffwechsels von Zelllinien eine Verbesserung des Wachstums- und Produktionsverhaltens ermöglicht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultivierung**

#### **2.1.1 Zellen**

##### **2.1.1.1 Säugerzelllinien**

##### **BHK-21 A (abgeleitet von ATCC CLL 10)**

Bei der BHK Zellinie handelt es sich um eine permanente Zellinie aus Goldhamsterzellen (*Mesocricetus auratus*). Die BHK-21 A ist ein Subklon der 1984 von ATCC erhaltenen Zellinie, die durch zahlreiche Subklonierungs- und Selektionsschritte erhalten wurde. Im Vergleich zur Ursprungszellinie weist sie deutlich höhere Expressionsraten von rekombinanten Genen auf (Karreman et al., 1996). Diese Zellinie wurde von der Abteilung Genregulation und Differenzierung der GBF erhalten.

##### **BHK-21 A PYC2 Klone**

Diese Zellklone stammten aus der Cotransfektion von BHK-21 A Zellen mit dem pCMVSHE-PYC2 (enthält das Pyruvat-Carboxylase Gen) und dem pAG60 (enthält das Gen für die Neomycinresistenz). Im weiteren wird die Bezeichnung BHK-21 A PYC2 mit BHK-21 PYC2 abgekürzt.

##### **BHK-21 A Kontrolle**

Diese Zellinie war eine Mischung von vielen stabilen Zellklonen, die aus einer Transfektion von BHK-21 A Zellen mit dem pAG60 Plasmid hervorgegangen sind. Sie diente als Kontrollkultur für Versuche mit den PYC-exprimierenden Zellen. Im weiteren wird sie nur noch als "Kontrolle" bezeichnet.

##### **BHK-21 A PYC2-rhuEPO**

Diese Zellinie ist eine Mischung von verschiedenen Zellklonen, die aus der Transfektion des BHK-21 A PYC2 Klon 10 mit dem bicistronischem EGFP-rhuEPO Plasmid hervorgegangen sind. Sie enthalten die Resistenzgene gegen G418 und Hygromycin. Diese Zellen wurden nach der Transfektion mit dem FACS sortiert (vgl.

Abschnitt 3.3.1). Diese Zelllinie wird fortan zur Erleichterung und zum besseren Verständnis mit PYC2-rhuEPO abgekürzt.

### **BHK-21 A Kontrolle-rhuEPO**

Als Kontrolle für vergleichende Versuche zur Produktivität wurde die Zelllinie BHK-21 A Kontrolle mit dem bicistronischem EGFP-rhuEPO Vektor transfiziert. Stabile Zellklone, die aus dieser Transfektion hervorgegangen sind wurden wie die PYC2-rhuEPO Zellen mit Hilfe des FACS sortiert und dienten als Kontrolle für Versuche mit der PYC2-exprimierenden PYC2-rhuEPO Zelllinie. Diese Zelllinie ist ebenfalls resistent gegen G418 und Hygromycin. Die Bezeichnung dieser Zelllinie wurde zu Kontrolle-rhuEPO abgekürzt.

#### **2.1.1.2 Insektenzellen**

##### **IPLB Sf-21AE**

Die Zelllinie IPLB-Sf-21AE ist eine Insektenzelllinie und wurde 1977 aus Ovarien der Lepidopterenart *Spodoptera frugiperda* von Vaughn et al. (1977) etabliert. Sie wurde von J. Claus, Universidad National del Litoral, Santa Fe, Argentinien, zur Verfügung gestellt.

#### **2.1.1.3 Primärzellen**

##### **Mausleberzellen**

Die untersuchten Zellen stammten von der Leber einer kurz vor dem Experiment getöteten Maus. Die Leber wurde vorsichtig entfernt ohne ihr größere Schnitte zuzufügen, und bis zum Aufschluß in eiskalter PBS Lösung ( $8 \text{ g l}^{-1} \text{ NaCl}$ ,  $0,2 \text{ g l}^{-1} \text{ KCl}$ ,  $1,44 \text{ g l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $0,24 \text{ g l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ) mit Zusatz von  $200 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  Leupeptin als Proteaseinhibitor aufbewahrt.

##### **Mausnierenzellen**

Die untersuchten Zellen stammten von der Niere einer ebenfalls kurz vor dem Experiment getöteten Maus. Die Niere wurde von der Entfernung aus dem Mäusekörper bis kurz vor dem Aufschluß genauso behandelt wie im obigen Abschnitt

beschrieben.

#### **2.1.1.4 Bakterienstämme**

##### ***Escherichia Coli* Top10**

Der *E.coli*-Stamm Top10 wurde von der Abteilung Regulierung und Differenzierung der GBF erhalten.

##### ***Escherichia Coli* TG2**

Der *E.coli*-Stamm TG2 wurde von der Abteilung Zell- und Immunbiologie der GBF erhalten.

#### **2.1.2 Nährmedien und Medienzusätze**

##### **2.1.2.1 Säugerzellnährmedien und Supplemente**

###### **ZKT-1 Medium**

Alle Zellkultivierungen wurden in dem kommerziell erhältlichen ZKT-1 Medium (Sigma, Deisenhofen, Cat. Nr. I-99003) durchgeführt. Dieses Medium basiert auf einer 1:1 Mischung von Iscove's MEM und Ham's F12- Medium (Jäger et al., 1988). Dem Medium wurden  $3,61 \text{ g l}^{-1} \text{ NaHCO}_3$  und jeweils 5 % Serum bei Kultivierungen in Röhreinheiten bzw. 2,5 % Serum in Bioreaktoren zugesetzt. Das Pulvermedium wurde nach dem Auflösen in Milli-Q Wasser über eine Filterstraße (Pall, Portsmouth, England) mit Nylonfilterelemente absteigender Porengröße ( $1 \mu\text{m}$ ,  $0,2 \mu\text{m}$  und  $0,1 \mu\text{m}$ ) sterilfiltriert.

###### **Serum**

Nach dem Auftauen wurde das fötale Kälberserum (FCS) (Seromed, Biochrom KG, Berlin) zur Inaktivierung der cytolytischen Proteine des Komplementsystems eine Stunde bei  $56^\circ\text{C}$  im Wasserbad (Köttermann 3042, Uetze-Hänigsen) inkubiert. Anschließend erfolgte die Lagerung bei  $4^\circ\text{C}$ .

### 2.1.2.2 Nähemedien für *E.coli*

#### **LB-Medium (Luria-Bertani Medium)**

Als Standard Wachstumsmedium für *E.coli* in Suspension wurde flüssiges LB- Medium verwendet. Das Medium setzte sich aus 10 g l<sup>-1</sup> Bacto-Trypton (Difco Laboratories, Detroit, USA), 5 g l<sup>-1</sup> Hefeextrakt (Sigma) und 10 g l<sup>-1</sup> NaCl (Riedel-de-Häen, Seelze) zusammen. Der pH-Wert des Mediums wurde vor der 20minütigen Dampfsterilisation bei 121°C mit NaOH auf pH 7,0 justiert. Für die Kultivierung auf Petrischalen wurde dem Medium vor der Sterilisation 15 g l<sup>-1</sup> Bacto-Agar (Difco Laboratories) zugesetzt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf 60°C gebracht und in sterile Petrischalen (Greiner Labortechnik, Solingen) gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Petrischalen bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

#### **SOC Medium**

Für die Kultivierung der *E.coli*-Zellen unmittelbar nach der Elektroporation (s. Abschnitt 2.8.3) wurde das SOC Medium verwendet. Dieses setzt sich aus 20 g l<sup>-1</sup> Bacto-Trypton, 5 g l<sup>-1</sup> Hefeextrakt, 0,5 g l<sup>-1</sup> NaCl (Riedel-de-Häen) und 0,186 g l<sup>-1</sup> KCl (Merck, Darmstadt) zusammen. Nach dem Einstellen des pH Wertes auf 7,0 wurde das Medium 20 Minuten bei 121°C dampfsterilisiert. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden dem Medium 10 mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> und 20 mmol l<sup>-1</sup> Glucose aus einer 100 fach konzentrierten Stammlösung zugesetzt. Die Stammlösungen wurden über einen Spritzenvorsatzfilter (Millipore, Eschborn, 0,22 µm) sterilfiltriert.

#### **Ampicillin als Selektionszusatz**

Zur Selektion von Ampicillin resistenten *E.coli*-Klonen wurden die Zellen auf ampicillinhaltigen Platten kultiviert. Dazu wurde dem 50°C heißen Agar-LB-Medium Ampicillin (Sigma) in einer Konzentration von 0,5 mg l<sup>-1</sup> aus einer Stammlösung von 50 mg l<sup>-1</sup> in 70 %-igem Ethanol (J.T. Baker, Deventer, Holland) zugesetzt.

## **2.1.3 Stammhaltung und Kultivierung**

### **2.1.3.1 Stammhaltung von Säugerzellen**

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter Laminar flow Arbeitsbänken der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt (Heraeus Liminair HBB2472S, Heraeus, Hanau). Zur Kulturhaltung in Zellkulturflaschen (Falcon, Vertrieb Firma Becton Dickinson, Heidelberg) wurden die Zellen in einem Inkubator (CO<sub>2</sub>-Inkubator Cytoperm 8080, Heraeus) bei 37°C, 12 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. T-25 Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, Nunc, Wiesbaden) wurden mit 5 ml Medium, T-75 Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) mit 20 ml und T-175 Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) mit 70 ml Medium gefüllt. Die adhärenenten Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz passagiert. Dazu wurden die Zellen mit einer 0,125 %-igen Trypsinlösung (s. unten) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde anschließend durch die Zugabe von zehnfachem Volumen FCS-haltigen Mediums (5% v/v) gestoppt. Aus der Trypsin-inhibierten Zellsuspension wurde ein Teil zur Inokulation einer neuen T-Flasche entnommen. Suspensionskulturen in 125 bzw. 500 ml Röhreinheiten (Spinnerflaschen) wurden unter den gleichen Inkubationsbedingungen (Inkubator Biocenter 2001, Salvis, Reussbühl, Schweiz) bei einer Durchmischungsgeschwindigkeit von 40 Upm auf Spinnertableaus (Cellspin, Tecnomara, Fernwald) kultiviert. Die Suspensionszellen wurden nach Erreichen einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  passagiert.

### **Trypsinlösung**

Die gebrauchsfertige Trypsinlösung setzte sich aus 50 ml einer 2,5 %-igen Trypsinlösung (Gibco-BRL, Eggenstein) und 3,3 mmol EDTA (Merck) in einem Gesamtvolumen von einem Liter PBS Lösung (phosphate buffered saline) zusammen.

### **Mediensupplemente zur Zellselektion**

Zur Selektion von transfizierten Zellen wurden die Zellen in ZKT-1 Medium mit Antibiotikazusätzen kultiviert. Zellen, die mit dem Neomycin Resistenzgen transfiziert worden waren, erhielten  $600 \mu\text{g ml}^{-1}$  Geneticin (Gibco-BRL) als Zusatz ins Medium. Mit dem Hygromycin B-Resistenzgen transfizierte Zellen erhielten  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  Hygromycin

B (Sigma) als Zusatz zum Medium. Zellen, die beide Resistenzen trugen, wurden im ZKT-1 Medium mit beiden Antibiotika in den jeweils oben angegebenen Konzentrationen kultiviert. Die Kultivierungen im Bioreaktor wurden frei von Antibiotikazusätzen ausgeführt, es sei denn, es wird ausdrücklich anders vermerkt.

### **Kryopräservierung von Säugerzellen**

Zur Langzeitlagerung wurden Zellen aus Suspensions- oder Flaschenkulturen geerntet und bei 190 g abzentrifugiert (Rotantata RP, Hettich, Tuttlingen). Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (80 % (v/v) FCS, 12,5 % ZKT-1 Medium, 7,5 % DMSO) zu einer Konzentration von  $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  ml<sup>-1</sup> aufgenommen. Pro Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) wurden 1,8 ml Zellsuspension eingefüllt und diese für ca. 24 h in einem speziellen Gefrierbehälter (freezing container, Nalgene, Rochester, NY) in Isopropanol (Merck) bei -70°C gelagert. Anschließend wurden die Röhrchen in die Dampfphase über flüssigem Stickstoff überführt.

### **Subklonierung von transfizierten BHK Zellen**

Nach der Selektion von BHK Zellen wurden einzelne Klone mit einer dünnen sterilen P10-Pipettenspitze (Gilson, Abimed, Langenfeld) von der vom Medium befreiten Platte gepickt und die Zellen in einem Loch einer 96-Loch-Platte (Nunc) resuspendiert, das mit 200 µl Medium befüllt worden war. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen auf eine 24-Loch-Platte überführt und schließlich auf T-25 Zellkulturflaschen umgesetzt.

#### **2.1.3.2 Kultivierung von *E.Coli*-Stämmen**

Die *E.coli*-Zellen wurden nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) auf Agarplatten oder als Suspensionskultur in Schüttelkolben (Schott, Mainz) bei 37°C im Brutraum kultiviert. Die Erlenmeyerkolben wurden mit 180 Upm geschüttelt (Certomat, B. Braun AG, Melsungen).

### **Kryopräservierung von *E.Coli*-Zellen**

Zur Langzeitlagerung von *E.coli*-Klonen wurden die Zellen in einer Glycerinkultur bei -70°C eingefroren. Die *E.coli*-Zellen wurden dazu in LB-Medium bis zu einer optischen

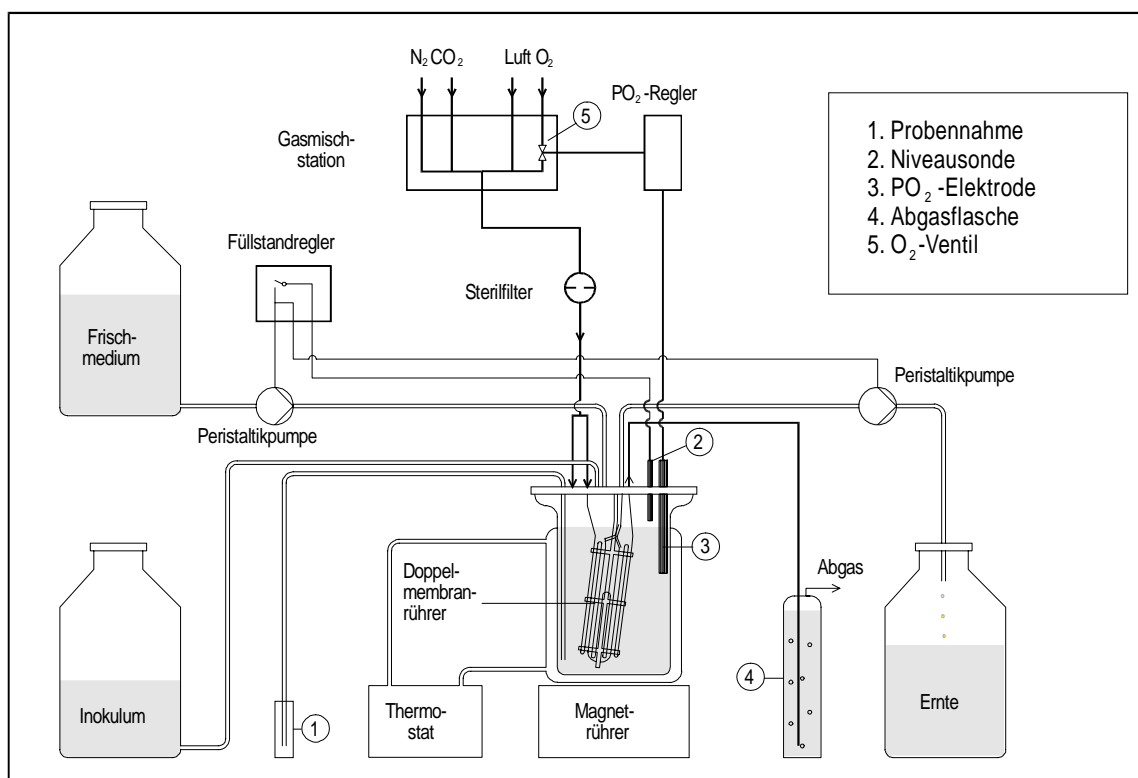


Dichte von 600 kultiviert. Von dieser Kultur wurden 800 µl mit dem gleichem Volumen 80 %-igem Glycerin in einem sterilen Kryoröhrchen vereinigt und bei -70°C gelagert. Die Glycerinlösung wurde zuvor durch Autoklavieren sterilisiert.

## 2.1.4 Bioreaktorsystem

### 2.1.4.1 Rührreaktor mit blasenfreier Begasung

Zur Kultivierung der BHK-Zellen in Suspension wurde der 1,6 l kontinuierlich perfundierte Doppelmembran-Rührer-Reaktor mit blasenfreier Begasung und kontinuierlicher Perfusion verwendet (Lehmann et al., 1985, GBF- Eigenbau, s. Abb. 2.1.4.1).



**Abb. 2.1.4.1:** Schematische Darstellung eines kontinuierlich perfundierten Doppelmembran-Rührer-Reaktors. Im Chemostatbetrieb wurde die Zellsuspension über ein zusätzliches Probenahmerohr kontinuierlich mit Hilfe einer Schlauchpumpe in die Ernteflasche abgesaugt.

## **2.2 Begleitende Analytik bei Säugerzellkultivierungen**

### **2.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahlen und Vitalität**

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die gegebenenfalls mit Medium verdünnte Zellsuspension mit einer 0,5 %-igen Trypanblaulösung (Roche Diagnostics) im Verhältnis 1:1 vermischt und die Anzahl lebender und toter Zellen durch Auszählen von acht Großquadraten einer Neubauer-Zählkammer (BLB, Braunschweig) bei 100-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Typ Standard 14, Zeiss, Göttingen) bestimmt. Der hydrophile Farbstoff Trypanblau dringt dabei in die geschädigte Membran toter Zellen ein und färbt diese selektiv blau an.

### **2.2.2 Zellkernzählung**

Die Zellkernzählung erfolgte häufig zusätzlich zur Lebendzellzahlbestimmung, besonders dann, wenn die Zellen zur Spheroidbildung neigten (Lin et al., 1991). Dazu wurde 1 ml Zellsuspension 1 Minute bei 10000 Upm (Hettich Mikroliter, Hettich) zentrifugiert. 800 µl des Überstandes wurden verworfen und durch 800 µl Kristallviolettlösung (2,1 % Zitronensäuremonohydrat (Merck), 0,05 % Kristallviolett (Merck), 1 % TritonX-100 (Sigma)) ersetzt. Nach 30 Sekunden kräftiges Schütteln (Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Zürich) wurden die freigesetzten violett gefärbten Kerne durch Auszählen von acht Großquadraten einer Neubauer-Zählkammer (BLB) bei 400-facher Vergrößerung gezählt.

### **2.2.3 Bestimmung der Zellzahlen mit dem CASY**

Zur Bestimmung der Zellkernkonzentrationen wurde 1 ml Zellsuspension 1 Minute bei 10000 Upm (Hettich Mikroliter, Hettich) zentrifugiert und 800 µl des Überstandes durch CASY Zellextraktionspuffer (21 g l<sup>-1</sup> Zitronensäure·H<sub>2</sub>O, 10,01 g l<sup>-1</sup> Cetyltrimethylammoniumbromid (beides Merck)) ersetzt. Das Zellpellet wurde durch 30 Sekunden kräftiges schütteln (Vortex Genie 2) resuspendiert und die Zellen dabei aufgeschlossen. Aus dieser Suspension wurde eine Verdünnung in CASYTON Puffer (7,93 g l<sup>-1</sup> NaCl, 0,35 g l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA, 0,4 g l<sup>-1</sup> KCl, 0,22 g l<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2,45 g l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,2 g l<sup>-1</sup> NaN<sub>3</sub>) hergestellt und im CASY mit einer 150 µm Kapillare im

---

Meßbereich von 0-20 µm gemessen.

### **2.2.4 Zellvolumenbestimmung**

Zur Bestimmung des Zellvolumens wurden 5-10 ml Zellsuspension in speziellen 10 ml Glasröhrchen (Nr. 45225, Kimax, USA) abzentrifugiert. Diese Röhrchen sind unten verjüngt und erlauben eine Bestimmung bis zu 50 µl Pelletvolumen.

### **2.2.5 Bestimmung des zellulären Proteingehaltes**

Die Bestimmung des Zellproteingehaltes wurde mit Hilfe der BCA-Methode nach Smith et al. (1985) durchgeführt.  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  Zellen wurden bei 200 g sedimentiert und einmal in 1 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Sedimentation bei 200 g wurde das Zellpellet in 1 ml Triton Puffer (100 m mol l<sup>-1</sup> NaCl (Merck), 50 m mol l<sup>-1</sup> HEPES (Sigma), 2,5 % (v/v) Triton-X-100 (Sigma), pH 7,2) resuspendiert und auf dem Vortex-Schüttler (Vortex Genie 2) kräftig geschüttelt. Bis zur Vermessung wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurden die Proben kräftig geschüttelt (Vortex Genie 2) und 50 µl des Homogenisats mit 1 ml Reagenz (1 Teil 4 %-ige CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 50 Teile BCA Reagenz (Sigma), täglich frisch angesetzt) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend 3 Minuten auf Eis abgestoppt. Die Extinktion wurde bei 562 nm gegen eine Nullprobe, die nur Triton-Puffer und Reagenz enthielt, gemessen (Ultrospec II Spectralphotometer, LKB, Freiburg). Es wurden alle Proben als Doppelbestimmung gemessen. Eichkurven wurden mit einer BSA Standardproteinlösung (1 mg l<sup>-1</sup>, Sigma) aufgenommen.

### **2.2.6 Quantitative Bestimmung der Glucose und Lactatkonzentration**

Zur Bestimmung des Glucose- und Lactatgehaltes von Kulturmedien und -überständen wurde ein Glucose/Lactat-Analysator der Firma Yellow Springs Instruments (YSI, Modell 2700 Select, Yellow Springs, Ohio, USA) verwendet. Die Messung basiert auf einem enzymatisch-elektrochemisch gekoppelten Prozeß. Dabei wird das von den immobilisierten Enzymen Glucose- und Lactat-Oxidase gebildete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit einer nachgeschalteten Pt/AgCl/Ag-Elektrode amperometrisch gemessen.

### **2.2.7 Quantitative Bestimmung freier Aminosäuren**

Zur Bestimmung der freien Aminosäuren in Medien und Kulturüberständen wurden die Proben nach der Proteinfällung in Perchlorsäure (Merck), in der Gegenwart von Mercaptoethanol (Fluka, Buchs, Schweiz) mit ortho-Phthaldialdehyd (Serva, Heidelberg) umgesetzt. Die dabei entstehenden fluoreszenzfähigen Isoindolderivate wurden über eine reversed-phase-HPLC (System 450 MT2, Kontron Instruments, Hamburg; Säulen: AminoOPA 3  $\mu\text{m}$ , Grom, Herrenberg) getrennt und fluorimetrisch gemessen (Detektor SFM 25, Kontron Instruments). Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des internen Standards Norvalin (Ryll et al., 1990).

### **2.2.8 Bestimmung des Ammoniumgehalts**

Die Ammoniumkonzentration in Zellüberständen wurde mit einer gassensitiven Ammonium-Elektrode (Ingold,  $\text{NH}_3$ -Elektrode, Ingold Meßtechnik AG, Urdorf, Schweiz) durchgeführt. Vor jeder Meßreihe wurde die Elektrode im Konzentrationsbereich von 0,5-10  $\text{mmol l}^{-1}$  Ammoniumchlorid kalibriert.

### **2.2.9 Nukleotidanalytik**

#### **2.2.9.1 Extraktion intrazellulärer Nukleotide aus Säugerzellen**

##### **HPLC-System**

Die Trennung der extrahierten Nukleotide wurde mit Hilfe eines HPLC-Systems nach der von Ryll (1991) sowie Ryll und Wagner (1991) ausführlich beschriebenen Methode durchgeführt.

##### **Trennmethodik**

Die Trennung der Nukleotide beruhte auf eine IP-RP-HPLC Methode und ist ebenfalls in Ryll (1991) sowie Ryll und Wagner (1991) gut beschrieben.

## **2.3 Bestimmung der Pyruvat-Carboxylase Enzymaktivität**

### **2.3.1 Extraktionspuffer**

Der Extraktionspuffer für den Pyruvat-Carboxylase Test sowie für die Western Blots setzte sich in Anlehnung an Ahmad et al., (1986) wie folgt zusammen: 300 mmol l<sup>-1</sup> Sucrose (Sigma), 100 mmol l<sup>-1</sup> KCl (Riedel-de-Haën), 1 mmol l<sup>-1</sup> EDTA (Serva), 10 mmol l<sup>-1</sup> DTT (Serva), 0,1 % (v/v) Triton X-100 (Sigma), 200 µmol l<sup>-1</sup> Leupeptin (Sigma) in 50 mmol l<sup>-1</sup> Tris Puffer, pH 7,4.

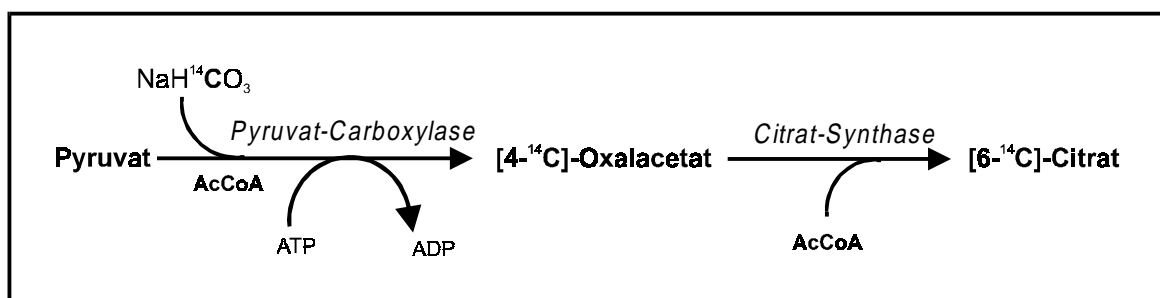
### **2.3.2 Aufschlußmethode für Säugerzelllinien und Primärzellen**

Die Zellen, gewonnen aus Suspensionskulturen oder durch Abtrypsinieren, wurden 3 Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg). Das Zellpellet wurde einmal in eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in der entsprechenden Menge Aufschlußpuffer aufgenommen, so daß sich eine Zellkonzentration von 1x10<sup>7</sup> ml<sup>-1</sup> einstellte. Der vollständige Aufschluß von Zellen und Mitochondrien erfolgte in einem eisgekühltem Homogenisator (20 Stöße) (Dounce, Braun-Diessel Biotech, Melsungen, Germany). Der Zellysatz wurde anschließend 3 Minuten bei 3000 Upm abzentrifugiert und der Überstand für weitere Experimente verwendet. Zum Aufschluß von primären Zellen wurden exakt abgewogene Stücke vom Tierorgan entfernt und in gleicher Weise wie oben beschrieben aufgeschlossen (10 mg ml<sup>-1</sup>).

### **2.3.3 Enzymtest und Meßmethodik**

Der Pyruvat-Carboxylase Enzymtest war eine Modifikation der von Atkin et al. (1979) beschriebenen Nachweisreaktion. Sie beruht auf dem Einbau von radioaktiv markiertem CO<sub>2</sub> in Pyruvat, wobei radioaktives Oxalacetat entsteht (s. Abb. 2.3.3). Überschüssiges NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> wird nach Beendigung der Reaktion aus der Lösung ausgetrieben, wobei gebundenes Carbonat in der Lösung verbleibt. Für den Test wurden 0,05 mmol MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mmol ATP, 3,3 µmol AcCoA, und 0,1 mmol

Natriumpyruvat als Pulver vorgelegt und in 10 ml Zellysat gelöst. Durch die Zugabe von 500 µl radioaktiv markiertem  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  ( $\Delta$  250 µmol, 1,85 MBq mmol<sup>-1</sup>, 1,85 Mbq ml<sup>-1</sup>, Amersham, Braunschweig) und 367 nkat (10 µl) Citrat-Synthase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde die Reaktion gestartet. Für die Blindproben wurde kein Natriumpyruvat in die Testmischung zugegeben. Der Test wurde über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37°C ausgeführt.



**Abb. 2.3.3:** Reaktionsfolge zum Nachweis der Pyruvat-Carboxylase. Radioaktiv markiertes  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  wird in der Pyruvat-Carboxylase Reaktion gebunden und schließlich als stabiles Citrat nachgewiesen. Ungebundenes  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  wird direkt nach der Reaktion aus der Lösung ausgetrieben und die gebundene Radioaktivität gemessen.

Alle 15 Minuten wurde ein Aliquot zu 1 ml aus dem Reaktionsansatz entnommen, und die Reaktion durch die Zugabe von 110 µl 5 mol l<sup>-1</sup> PCA gestoppt. Die ausgefallenen Proteine wurden bei 14000 Upm 3 Minuten lang sedimentiert und der klare Überstand wurde 5 Minuten lang unter einem Abzug mit  $\text{CO}_2$  begast, um überschüssiges  $^{14}\text{CO}_2$  aus der Lösung auszutreiben. Anschließend wurde 1 ml dieser abgestoppten Lösung mit 2 ml Quicksafe A Scintillationscocktail (Zinsser, Frankfurt) versetzt, gut geschüttelt und in einem Scintillationszähler vermessen (LS 5000 CE, Beckman Instruments, Palo Alto, CA).

### 2.3.4 Auswertung der Enzymaktivität

Die Konzentration von gebundenem Carbonat wurde anhand einer zuvor aufgestellten Kalibriergerade im Bereich von 2312 bis 37000 Bq (0,0625 bis 1 µCi; 1µCi=37000Bq) berechnet. Den Zählraten pro Minute wurden Radioaktivitätsmengen (in Bq)

zugewiesen und diesen wiederum eine bestimmte Substanzkonzentration.

## **2.4 Immunoblot Nachweis der Pyruvat-Carboxylase**

### **2.4.1 SDS-PAGE Elektrophorese**

$1 \times 10^6$  Zellen wurden bei 1000 Upm zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf) und das Zellpellet in 5 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 0,5 ml Extraktionspuffer (s. Abschnitt 2.3.1) aufgeschlossen. Der Zellysat wurde mit dem gleichen Volumen eines zweifach konzentrierten Western Blot Probenpuffers (64 mmol  $\text{l}^{-1}$  Tris-HCl, 1,3 % (w/v) SDS, 30 mmol  $\text{l}^{-1}$  DTT, 17 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (v/v) Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt und 5 Minuten lang bei 95°C inkubiert. 10  $\mu\text{l}$  dieser Probe wurden auf einem 7,5 %-igen Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) aufgetragen und unter folgenden Bedingungen elektrophoriert:

30 Minuten	75 V, 400 mA, 50 W
60 Minuten	150 V, 400 mA, 200 W

Eine mit einem Farbstoff gekoppelte Mischung aus den Proteinen Myosin ( $M_r = 197$  kDa),  $\beta$ -Galactosidase ( $M_r = 117$  kDa), Rinder Serum Albumin ( $M_r = 89$  kDa), und Ovalbumin ( $M_r = 52$  kDa) (Biorad, prestained High molecular weight standard) diente als Molmassenstandard. Wurde ein Vergleich zwischen den BHK-Zellen und Gewebszellen aus Organen angestellt, so wurden die Proteinmengen bestimmt und pro Geltasche die gleichen Proteinmengen aufgetragen.

### **2.4.2 Semi-dry Blotverfahren der Polyacrylamidgele**

Nach der Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele auf Hybond-C Nitrocellulose Membranen (Amersham Life Science, Buckinghamshire, England) geblottet. Dazu wurden die Membran und das Filterpapier (Electrode Paper Novablot (PKG/500), Pharmacia Biotech AB, Sweden) in der Größe des Gels zurechtgeschnitten und im Blotpuffer (6 g  $\text{l}^{-1}$  Tris-Base, 2,9 g  $\text{l}^{-1}$  Glycin, 0,37 g  $\text{l}^{-1}$  SDS, 20 % (v/v) Methanol) 5 Minuten äquilibriert. Die Reihenfolge des Blot Sandwiches war: Kathode, 9 Lagen

Filterpapier, Blotmembran, Polyacrylamidgel, 9 Lagen Filterpapier, Anode. Die Gele wurden 2 Stunden bei 30 V, 150 mA und maximal 30 W geblottet.

### 2.4.3 Immunreaktion

Die geblotteten Membranen wurden zunächst mit einer 5 %-igen BSA Lösung (in PBS) eine Stunde bei 37°C abgesättigt. Zur Inkubation mit dem primären Antikörper wurden 4 ml der BSA Lösung mit 2 ml einer TBS-Tween Lösung (20 mmol l<sup>-1</sup> Tris-Base, 0,137 NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20) vereinigt und 6 µl eines polyklonalen Kaninchen-anti-Hefe PYC2-Antikörpers dazugegeben, der freundlicherweise von der Abteilung Mikrobiologie der GBF zur Verfügung gestellt wurde. Diese Antikörper stammten aus immunisierten Kaninchen und sind zu 85 % gegen die Biotin-Bindungsstelle der Pyruvat-Carboxylase gerichtet (Manfred Rohde, Persönliche Kommunikation). Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Blots jeweils 10 Minuten in einer TBS-Tween und einer TBS-Tween Triton Lösung (TBS-Tween mit 0,1 % (v/v) TritonX-100) gewaschen und 1 Minute in TBS-Tween äquilibriert. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde in einer Lösung von 6 ml TBS-Tween und 6 µl eines Peroxidase gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörpers (1 mg ml<sup>-1</sup>, Dianova, Hamburg) durchgeführt. Die Blots wurden erneut wie oben beschrieben gewaschen. An Stelle des primären Antikörpers konnte auch mit Peroxidase gekoppeltes Streptavidin verwendet werden. Als starker Inhibitor bindet das Streptavidin irreversibel an die Biotin-Bindungsstelle aller Carboxylasen und läßt sie auf den Blots sichtbar werden. Eine Inkubation mit einem sekundären Antikörper entfiel in diesem Fall.

### 2.4.4 Nachweis der Immunreaktion über Chemolumineszenz

Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Banden mit Hilfe des ECL<sup>®</sup>-Kits (Amersham) sichtbar gemacht. Dazu wurden jeweils 4 ml aus den zwei Lösungen des Kits miteinander vereinigt und der Blot einige Minuten in dieser Lösung geschwenkt. Der Blot wurde anschließend zwischen zwei durchsichtige Folien gelegt und für 10 bis 40 Sekunden, je nach Intensität der Banden, auf einem Kodak X-OMAT AR Film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) belichtet und im Anschluß daran



entwickelt. Das Prinzip beruht auf einer Oxidation von einem cyclischen Diacylhydrazid, des Luminols, mit Hilfe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und des Enzyms Peroxidase unter alkalischen Bedingungen. Unmittelbar nach der Oxidation befindet sich das Luminol in einem angeregten Zustand und strahlt mit maximaler Chemolumineszenzlicht bei der Wellenlänge 428 nm ab.

## **2.5 Erythropoetin Analytik**

### **2.5.1 Quantifizierung der Erythropoetin Konzentration**

#### **EPO ELISA**

Zur Bestimmung der Erythropoetin (EPO) Konzentration in Zellkulturüberständen wurde ein kommerziell erhältliches EPO-ELISA Kit (Roche Diagnostics) verwendet. Die Analytik wurde gemäß der Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle Proben sowie die Standards wurden in Doppelbestimmungen getestet. Jeweils 50 µl Standard, in Probenpuffer (Lsg. 5 des Kits) vorverdünnte Proben sowie die positive Kontrolle wurden in die Öffnungen der ELISA-Platte pipettiert. Der Standard bestand aus aufgereinigtem CHO-rhuEPO-Protein, das in den Konzentrationen 0-1000 pg ml<sup>-1</sup> eingesetzt wurde. Weitere 50 µl eines Immunoreagenzes (Anti-hEPO-POD) wurden hinzugegeben, bevor die ELISA-Platte mit Folien abgedeckt und für drei Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Im Anschluß daran wurden die Platten entleert und dreimal mit einer Waschlösung gewaschen. Die Platten wurden anschließend zum Trocknen ausgeklopft. Zur Substratreaktion wurden 100 µl der Lösung 7 des Kits in die Öffnungen pipettiert und 8-15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die durch die Reaktion entstehende Farbänderung (blau) wurde durch die Zugabe von 25 µl einer Stop-Lösung (1 mol l<sup>-1</sup>  $\text{H}_2\text{SO}_4$  Lösung) beendet. Die Platte wurde anschließend für etwa 30-60 Sekunden geschüttelt und die Extinktionen in einem ELISA-Reader (SLT 340 ATTC, SLT Labinstrument, Crailsheim) bei 492 nm (Referenzfilter 620 nm) gemessen. Dabei war es wichtig zu beachten, daß die Platte nicht zu lange in der Stop-Lösung inkubiert wurde, da sich sonst durch ausfallende Kolloide falsche Ablesewerte ergaben.

Wie Vorversuche ergaben, hatte weder reines fötales Kälberserum noch der Zusatz

desselben zu Kulturmedien einen Einfluß auf die Genauigkeit des ELISA.

### **2.5.2      Aufreinigung von rhuEPO durch Immunaффinitätschromatographie**

Zur Aufreinigung des rhuEPO wurde eine Immunaффinitäts-Niederdrucksäule verwendet, die mit 4 g einer mit monoklonale anti-rhuEPO-Antikörpern (MAK 89-146/0056, Fibi et al., 1995) gekoppelte Sepharose 4B gefüllt war. Die Säule wurde über Nacht mit 30 bis 60 ml PBS Lösung (pH 7) bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml min<sup>-1</sup> äquiliбriert. Anschließend wurden 230 ml Kulturüberstand bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,2 ml min<sup>-1</sup> über die Säule gegeben. Zum Waschen der Säule wurden wieder 30 bis 60 ml PBS verwendet (0,5 ml min<sup>-1</sup>). Die Elution des rhuEPO erfolgte in einem 0,1 mol l<sup>-1</sup> Glycinpuffer (pH 2,5) bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml min<sup>-1</sup>. Es wurden Fraktionen von 1 ml Volumen aufgefangen. Das Elutionsprofil des rhuEPO wurde mit einem angeschlossenen UV-Spektrometer (2238 UVICORDS II, LKB Bromma, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) und Schreiber (2210 Recorder 1-channel, LKB Bromma) bei 230 nm aufgezeichnet. Die aufgefangenen Fraktionen wurden durch die Zugabe von 100 µl Trispuffer (1 mol l<sup>-1</sup>, pH 8,0) neutralisiert. Bei dieser Aufreinigung stellte Serum keinen Störfaktor dar.

### **2.5.3      Probenvorbereitung für den Nachweis von rhuEPO durch Western Blot Analyse**

Bei den Western Blots interferierten Proteine aus dem Kälberserum mit den eigentlichen rhuEPO-Banden. Aus diesem Grund wurden die Kultivierungen hierfür in proteinfreiem SMIF 7 Medium (LifeTechnologies) durchgeführt. 300 µl Kulturüberstand wurden in 4 bis 5 Volumen Ethanol (98 %) (J.T. Baker), das bei -20°C gekühlt wurde, versetzt. Die Mischung wurde zwei Stunden bei -20°C präzipitiert und das Protein anschließend bei 14000 Upm in der Eppendorf Zentrifuge (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg) sedimentiert. Das Pellet wurde in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac Sc110, Savant Instruments Inc., Farmingdale, N.Y.) getrocknet und anschließend in 20 µl Probenpuffer aufgenommen. Nach Denaturieren bei 95°C wurden 10 µl der

Probe auf ein 12 %-iges Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) Gel aufgetragen und wie unter Abschnitt 2.4.1 bis 2.4.3 beschrieben elektrophoriert und geblottet. Für die Immunreaktion mit dem primären Antikörper wurde ein Kaninchen-anti-rhuEPO Antiserum in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Als sekundäre Antikörper dienten Ziege-anti-Kaninchen IgG-Peroxidase-Konjugate, die ebenfalls in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurden.

#### **2.5.4 PNGase F-Verdau von rhuEPO**

Für die De-N-Glycosylierung des rhuEPO wurden 300 µl einer Fraktion aus der rhuEPO Aufreinigung entnommen und der pH auf 7-9 eingestellt. Anschließend wurden 2 U PNGase F Enzym (*Flavobacterium meningosepticum*, rekombinant aus *E.coli*, 0,2 U µl<sup>-1</sup>, Roche Diagnostics GmbH) zugesetzt und die Reaktion über Nacht bei 37°C durchgeführt. Ein Unit PNGase F entspricht der Enzymmenge, die 1 nmol Dansylfetuin Glycopeptid innerhalb von 1 h bei 37°C (pH 7,2) spaltet.

### **2.6 Messung intrazellulärer Fluxe radioaktiv markierter Substrate in den Citratcyclus**

#### **2.6.1 Glucoseflux und Pyruvatflux in den Citratcyclus**

Die Fluxrate von Glucosekohlenstoff sowie Pyruvatkohlenstoff in den Citratcyclus kann aus der freigesetzten Menge <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> aus D-[6-<sup>14</sup>C]-Glucose (Petch und Butler, 1994) bzw. [1-<sup>14</sup>C]-Pyruvat (Bartos et al., 1993) als einzige Substratquelle ermittelt werden. Die Durchführung erfolgte wie in folgendem Kapitel beschrieben.

#### **2.6.2 Messung von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> Freisetzungsraten**

Die CO<sub>2</sub> Freisetzungsraten wurden nach einer modifizierten Methode von Bartos et al. (1993) durchgeführt. Dazu wurde eine Suspension mit einer Zellkonzentration von 1 x 10<sup>7</sup> ml<sup>-1</sup> in pyruvathaltiger (5 g l<sup>-1</sup>) PBS Lösung bzw. in ZKT-1 Medium, für die Messungen des Glucosefluxes, angesetzt. Jeweils 0,75 ml dieser Zellsuspension

wurden mit 0,75 ml der pyruvathaltigen PBS Lösung, die mit  $8 \mu\text{l ml}^{-1}$   $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -Pyruvat ( $1850 \text{ Bq } \mu\text{l}^{-1}$ ,  $1,03 \text{ GBq mmol}^{-1}$ ,  $44030 \text{ Bq mg}^{-1}$ ) supplementiert war, in einer T-25 Zellkulturflasche vereinigt. Für die Glucoseflux Messungen wurden 0,75 ml der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen eines mit  $5 \mu\text{l ml}^{-1}$  D-[6- $^{14}\text{C}$ ]-Glucose ( $7400 \text{ Bq } \mu\text{l}^{-1}$ ,  $1,96 \text{ GBq mmol}^{-1}$ ,  $10,8 \text{ MBq mg}^{-1}$ ) supplementierten Mediums vermischt. Die zuvor mit Hilfe einer heißen Kanüle an der Zellkulturflasche angebrachte kleine Injektionsöffnung wurde mit einem Streifen Tesa Film (Beiersdorf, Hamburg) luftdicht verschlossen. Zum Absorbieren von freigesetztem  $\text{CO}_2$  wurde ein Eppendorfgefäß (0,5 ml, Eppendorf, Hamburg), das mit 300  $\mu\text{l}$  einer 1:1 (v/v) Mischung aus Phenylethylamin (Sigma) und Methanol (J.T.Baker) gefüllt war, vorsichtig an die Innenwand der Zellkulturflasche mit Klebeband (Tesa) angebracht. Die Zellkulturflaschen wurden anschließend mit ihrem Verschuß luftdicht verschlossen und in vertikaler Position bis zu 4 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert (Heraeus Inkubator 5, Heraeus). In Zeitintervallen von 30 Minuten wurden jeweils zwei Zellkulturflaschen aus dem Inkubator entfernt und der Zellmetabolismus durch die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  einer 10 %-igen (w/v) TCA-Lösung über die Injektionsöffnung gestoppt. Der Injektionsport wurde sofort wieder mit Klebeband verschlossen. Die Zellkulturflaschen wurden danach eine weitere Stunde im Inkubator inkubiert, um sicherzustellen, daß freigesetztes  $\text{CO}_2$  vollständig gebunden wurde. Die Phenylethylamin-Methanol Mischung mit dem gebundenem  $^{14}\text{CO}_2$  wurde mit 2 ml Quicksafe A Scintillationscocktail (Zinsser, Frankfurt) versetzt, gut gemischt und dann im Scintillationszähler (LS 5000 CE, Beckman Instruments) auf Radioaktivität vermessen. Zur Kalibrierung wurde eine  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ -Konzentrationsreihe im Bereich von 2312 bis 37000 Bq (0,0625 bis 1  $\mu\text{Ci}$ ;  $1\mu\text{Ci}=37000\text{Bq}$ ) vermessen.

## 2.7 Berechnete Größen

### 2.7.1 Spezifische Wachstumsrate

Die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  wurde wie folgt berechnet:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad [\text{h}^{-1}]$$

### 2.7.2 Produktbildungs- und Substratverbrauchsrate

#### Satzweiser Betrieb

Bei Satzbetrieb (Batchprozesse) wurden die Produktbildungs- bzw. Substratverbrauchsrate nach Kratje und Lincoln (1995) berechnet (Symbolverzeichnis s. nächste Seite).

Volumetrisch:

$$C_{\text{si}} = \frac{C_1 - C_2}{t_2 - t_1} \quad [\text{mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}]$$

Zellspezifisch:

$$C_{\text{si, x}} = \frac{C_1 - C_2}{(t_2 - t_1) \cdot \sqrt{X_1 \cdot X_2}} \quad [\text{mol s}^{-1}]$$

#### Kontinuierlicher Chemostatbetrieb

Im kontinuierlichem Kultivierungsmodus wurden die Produktbildungs- und Substratverbrauchsrate für die "steady state" Phase wie folgt berechnet:

Volumetrisch:

$$C_{si} = \frac{D \cdot (c_o - c_{st})}{V_R} \quad [\text{mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}]$$

Zellspezifisch:

$$C_{si} = \frac{D \cdot (c_o - c_{st})}{V_R \cdot X_{st}} \quad [\text{mol s}^{-1}]$$

### Kontinuierlicher Perfusionsbetrieb

Bei Perfusionsbetrieb wurden die zellspezifischen Produktbildungs- und Substratverbrauchsrate in Anlehnung an Kratje und Lincoln (1992) wie folgt berechnet:

$$C_{si, X} = \frac{\left[ e^{\frac{-P(t_2-t_1)}{V}} \cdot (c_o - c_1) - (c_o - c_2) \right] \cdot P \cdot 10^3}{\left( 1 - e^{\frac{-P(t_2-t_1)}{V}} \right) \cdot (\sqrt{X_1 \cdot X_2}) \cdot V} \quad [\text{mol s}^{-1}]$$

- $\mu$ : Wachstumsrate [ $\text{h}^{-1}$ ]
- $C_{si}$ : Volumetrische Substratverbrauchs- und Produktbildungsrate [ $\text{mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]
- $C_{si, X}$ : Zellspezifische Substratverbrauchs- und Produktbildungsrate [ $\text{mol s}^{-1}$ ]
- $c_o$ : Substrat- bzw. Produktkonzentration im Frischmedium [ $\text{mol l}^{-1}$ ]
- $c_1$ : Substrat- bzw. Produktkonzentration zum Zeitpunkt  $t_1$  [ $\text{mol l}^{-1}$ ]
- $c_2$ : Substrat- bzw. Produktkonzentration zum Zeitpunkt  $t_2$  [ $\text{mol l}^{-1}$ ]
- $c_{st}$ : Substrat- bzw. Produktkonzentration im "steady state" [ $\text{mol l}^{-1}$ ]
- $t_1, t_2$ : Zeitpunkte 1 bzw. 2 [s]

---

$X_1, X_2$ :	Zellkonzentration zum Zeitpunkt 1 bzw. 2 [ $l^{-1}$ ]
$X_{st}$ :	Zellkonzentration im "steady state" [ $l^{-1}$ ]
$V_R$ :	Volumen des Reaktors [l]
$D$ :	Verdünnungs- bzw. Bleedingrate [ $l\ s^{-1}$ ]
$P$ :	Perfusionsrate [ $l\ s^{-1}$ ]

### 2.7.3 Berechnung der Produktausbeute in einem kontinuierlich perfundierten Reaktor

Für die Berechnung der gesamten rhuEPO-Ausbeute in einem kontinuierlich perfundierten Reaktor wurde folgende Formel verwendet:

$$Y_{EPO} = V_R \cdot \left( \sqrt{D_1 \cdot D_2} \right) \cdot \frac{(t_2 - t_1)}{24} \cdot \sqrt{C_{EPO1} \cdot C_{EPO2}} \quad [ng]$$

$D$ :	Perfusionsrate ( $d^{-1}$ )
$V_R$ :	Reaktorvolumen (2500 ml)
$t$ :	Kultivierungszeitpunkt (h)
$C_{EPO1}$ :	rhuEPO-Konzentration zum Zeitpunkt 1 ( $ng\ ml^{-1}$ )
$Y_{EPO}$ :	rhuEPO-Ausbeute (ng)

### 2.7.4 Berechnung nukleotidspezifischer Kennzahlen

#### Der NTP-Wert

Der NTP-Wert beschreibt das Verhältnis zwischen den Summen der Purin- und Pyrimidintriphosphate:

$$\text{NTP} = \frac{\text{ATP} + \text{GTP}}{\text{UTP} + \text{CTP}}$$

**Der U-Wert**

Der U-wert beschreibt das Verhältnis zwischen UTP und den beiden UDP aktivierten N-Acetyl-Hexosaminen UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc:

$$\text{U - Wert} = \frac{\text{UTP}}{\text{UDPGNAc}}$$

**Der NTP/U- Wert**

Der NTP/U Wert stellt den Quotienten aus dem NTP- und dem U-Wert dar.

**2.7.5 Mittelwert, Standardabweichung und Konfidenzintervall****Mittelwert**

Der Mittelwert von mehreren Meßwerten wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

**Standardabweichung**

Die Berechnung der Standardabweichung  $\sigma$  erfolgte nach folgender Formel:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$



### Konfidenzintervall

Die Berechnung der Konfidenzintervalle erfolgte nach folgender Formel:

$$u_{\bar{x}} = \sigma \cdot \frac{a}{\sqrt{n}}$$

$\sigma$ :	Standardabweichung
$\bar{x}$ :	Mittelwert bzw. Schätzwert einer Meßreihe
$x_i$ :	i-ter Meßwert einer Meßreihe
$n$ :	Anzahl der Messungen innerhalb einer Meßreihe
$a$ :	Intervallgrenze der Fehlerfunktion, $a$ ist abhängig von der gewählten Wahrscheinlichkeit $P$ (verwendet wurde $P=95,45\%$ ; $a=2,00$ )
$u_{\bar{x}}$ :	Konfidenzintervall (Differenz zwischen Erwartungswert und Schätzwert)

## 2.8 Vektorkonstruktion und molekularbiologische Arbeiten

### 2.8.1 Strategie zur Konstruktion eines PYC2-Vektors für die Transfektion von Säugerzellen

Zur Einführung der Pyruvat-Carboxylase in die BHK Zellen mußte zunächst ein Vektor konstruiert werden, der alle für die Expression in einem Mammaliasystem notwendigen Transkriptions- und Translationselemente enthält. Dazu mußte der von Rolf Stucka zur Verfügung gestellte Hefeexpressionsvektor pRS1 (Stucka et al. 1991) mit Hilfe von verschiedenen molekularbiologischen Methoden modifiziert werden. Die dabei verwendeten Enzyme und Substanzen stammten, falls nicht anders vermerkt, von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) bzw. New England Biolabs (Schwalbach, Taunus).

### 2.8.1.1 Hefevektor YEP352

Das pRS1 ist ein YEP352 Vektor (Hill et al., 1986), der ein 6 kb Sall Fragment mit dem PYC2-Gen (SCPYC2G, Accession No. X59890, EMBL-Datenbank) aus dem Chromosom II der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* enthält. Der YEP352 Vektor ist ein Hefe-*E.coli*-Shuttlevektor, der sich vom pUC18 ableitet.

### 2.8.1.2 Entfernung von Hefesequenzen mit Hilfe von PCR-Techniken

Der YEP352 Vektor wurde zunächst mit den Restriktionsenzymen SmaI und XhoI verdaut. Daraus wurde ein 4147 bp langes Fragment erhalten, das die 3557 bp lange codierende Sequenz der PYC2 beinhaltet. Da dieses Fragment jedoch außer den codierenden Sequenzen auch flankierende, regulatorische und sonstige hefespezifische Sequenzen aufwies, die mit einer späteren Genexpression oder Translation im Mammaliasystem interagieren und stören könnten, mußten diese vor dem Einbau in einem geeigneten Mammalia-Expressionsvektor entfernt werden. Dazu wurde auf PCR-Techniken zurückgegriffen, da keine geeigneten Einzelschnittstellen am Anfang und am Ende des PYC2-Gens vorlagen (s. Abb. 2.8.1.2a). Zur Entfernung der 5'-flankierenden Region wurde das 4147 bp lange Fragment mit den Restriktionsenzymen HindIII und PvuII geschnitten. Daraus ergab sich ein 411 bp langes Fragment, dessen Anfang die Startregion des PYC2-Gens beinhaltete. Dieses Fragment diente als Matrize für die PCR-Reaktion. Als Primer wurden jeweils ein 35 bzw. 28 Basen Oligonukleotid als oberer (am 5'Ende der Matrize) und unterer (am 3'Ende der Matrize) Primer verwendet. Nach der PCR-Reaktion wurde das Amplifikat mit dem PYC2 Restfragment religiert. Somit war das 5'Ende des PYC2-Gens von flankierenden Regionen befreit. Zur Entfernung der die 3'Region flankierenden Hefesequenzen aus der chromosomalen PYC2 Fragment wurde dieses Konstrukt mit den Enzymen SmaI und ClaI verdaut. Das kürzere 469 bp Teilfragment diente wieder als Template für eine PCR-Reaktion. Die Primer wurden so ausgewählt, daß der obere Primer an der ClaI-Schnittstelle im Gen lag, während der untere Primer genau mit dem Ende des Gens zusammenfiel. Das resultierende PCR Fragment hatte eine Länge von 220 bp. Am unteren Primer wurden außerdem zwei neue Schnittstellen, HindIII und SmaI eingefügt, um später das Isolieren des PYC2-Gens mit einem einzigen HindIII Verdau aus dem Vektor zu vereinfachen. Das PCR Amplifikat wurde erneut mit dem

Restfragment des PYC2-Gens ligiert. Aus der Ligation entstand ein HindIII/SmaI Fragment mit der vollständigen PYC2 codierenden Sequenz. Dieses Fragment wurde nunmehr in einen pCMVSHE-Mammaliavektor (GBF, Abteilung Genregulation und Differenzierung), der zuvor ebenfalls mit den Enzymen HindIII und SmaI verdaut worden war (s. Abb. 2.8.1.2b), durch Ligation eingebracht. Daraus entstand das zur Transfektion geeignete Plasmid pCMVSHE-PYC2.

### Verwendete Primer

Die verwendeten Oligonukleotidprimer für die PCR-Reaktion am 5'Ende hatten folgende Sequenz:

Obere Primer:

AAA AAA GCT TTA AAA TAT GAG CAG TAG CAA GAA AT

HindIII

Start

Untere Primer:

AAA AAA CAC CCA CAG ATT CAA TAA CTT C

Für die PCR-Reaktion am 3'Ende wurden folgende Primer verwendet:

Obere Primer:

AGG GTC TTT GGT GAA GAA GG

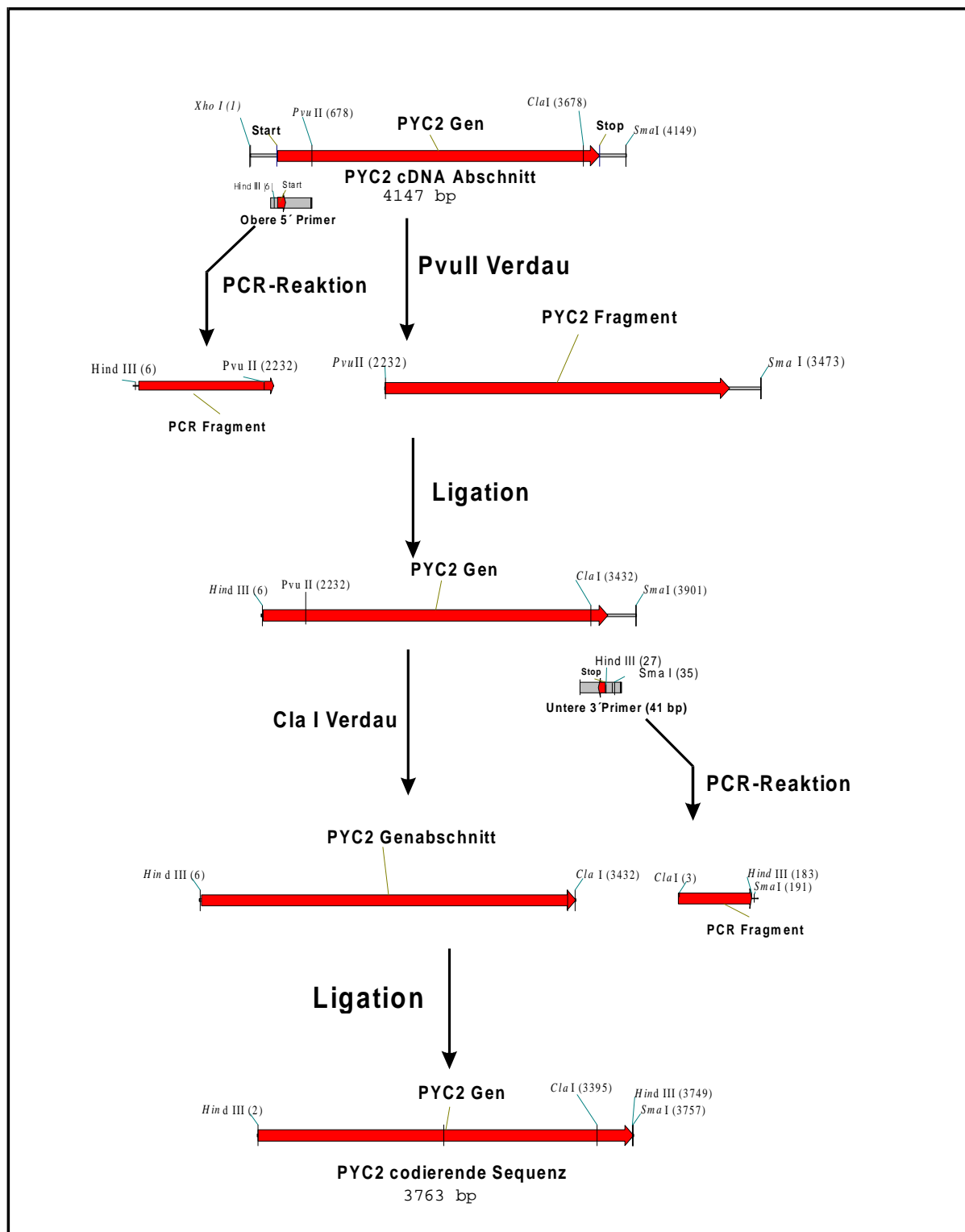
Untere Primer:

AAA ACC CGG G AA GCT TTA ATT AAC GAG TAA AAA TTA CTT TT

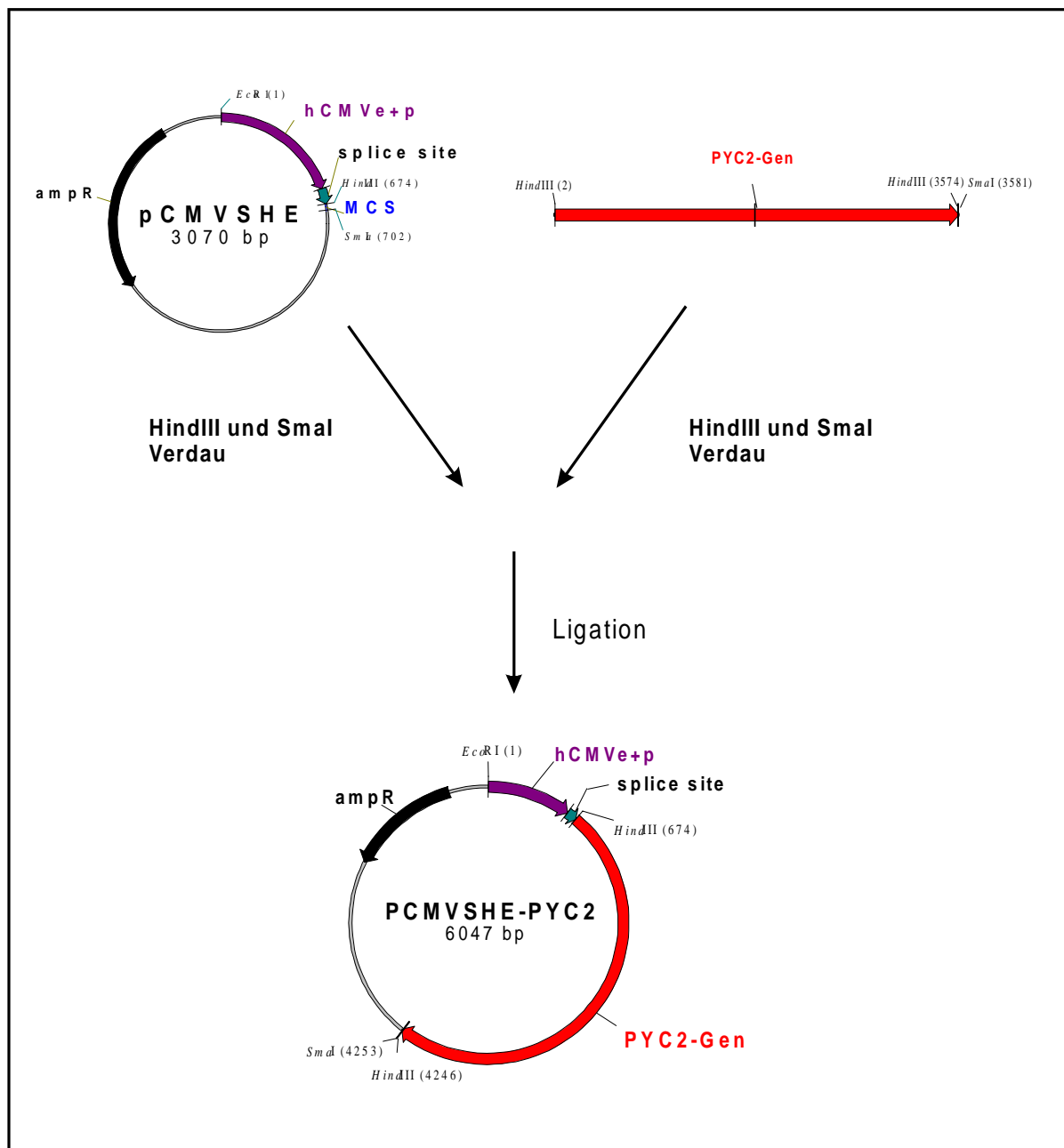
SmaI

HindIII

Stop



**Abb. 2.8.1.2a:** Vorgehensweise zur Entfernung der flankierenden Hefesequenzen an den Enden des PYC2-Gens.



**Abb. 2.8.1.2b:** Die Zusammensetzung des pCMVSHE-PYC2 Vektors aus dem Vektor pCMVSHE und der kodierenden Sequenz der PYC2-cDNA.

---

### Durchführung der PCR-Reaktion

Der PCR-Reaktionsansatz bestand aus folgenden Substanzen:

7,5 ng	Template DNA
16 µmol	dNTP Mix (2 mmol l <sup>-1</sup> pro Nukleotid)
25 pmol	Obere Primer (5 pmol µl <sup>-1</sup> ) (Gibco-BRL)
25 pmol	Untere Primer (5 pmol µl <sup>-1</sup> ) (Gibco-BRL)
1/10	PCR Puffer (10x)
0,5 µl	Taq Polymerase (Perkin Elmer, Vaterstetten)
Restvolumen	H <sub>2</sub> O

---

Summe der Volumina

Die PCR-Reaktion wurde 25 Zyklen bei einer Renaturierungstemperatur von 53°C, für die Reaktion am 5'Ende und 50°C für die Reaktion am 3'Ende in einem Thermocycler (Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer) ausgeführt.

### Minipräparation von Plasmid DNA

Zur schnellen Kontrolle von Plasmid DNA aus *E.coli* wurden Plasmid Mini-präparationen nach folgender Vorgehensweise hergestellt:

1. Eine Übernachtskultur von *E.coli*-Klonen in 2 ml Ampicillin haltigem LB-Medium wurden in 10 ml Kapsenberg-Röhrchen (Schott) kultiviert.
2. Das Medium wurde in 2,5 ml Eppendorfgefäße umgefüllt und 1 Minute bei 8000 Upm zentrifugiert.
3. Das Pellet wurde in 200 µl Lösung I (50 mmol l<sup>-1</sup> Glucose, 25 mmol l<sup>-1</sup> Tris Puffer, (pH 8), 10 mmol l<sup>-1</sup> EDTA) mit 4 mg ml<sup>-1</sup> Lysozym suspendiert, kräftig geschüttelt (Vortex Genie 2) und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
4. Dieser Suspension wurde 400 µl frisch angesetzte Lösung II (0,2 mol l<sup>-1</sup> NaOH, 1 % SDS) zugesetzt und 5 Minuten auf Eis gelagert.
5. Anschließend wurden 300 µl 7,5 mol l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc zugegeben, gemischt und 10

Minuten auf Eis inkubiert. Das neutralisierte Lysat wurde 3 Minuten bei 10000 Upm abzentrifugiert.

6. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA mit 0,6 bis 1 Volumenanteil Isopropanol (J.T.Baker) gefällt. Diese Mischung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 15000 Upm abzentrifugiert.
7. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und 3 Minuten bei Raumtemperatur und 15000 Upm abzentrifugiert.
8. Das Pellet wurde getrocknet und in 100 µl TE-Puffer (10 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 7,4; 1 mmol l<sup>-1</sup> EDTA) mit 2 µl RNase (5 mg ml<sup>-1</sup>) gelöst.
9. Für Verdauung in 20 µl Gesamtvolumen wurden 10-15 µl der Plasmid Mini-präparationen eingesetzt.

Die Mini-Präparationen sollten frisch sein und möglichst sofort für weitere Zwecke weiterverwendet werden. Bei Notwendigkeit zur Zwischen-lagerung sollte dies bei -20°C erfolgen, um den Verdau von DNA durch DNasen zu verhindern.

### **Plasmid Maxipräparationen**

Für Transfektionen wurden größere Mengen hochreine DNA benötigt. Die Präparation der DNA für diesen Zweck wurde mit Hilfe von kommerziell erhältlichen DNA Aufreinigungskits (JETSTAR, Genomed, Bad Oeynhausen) genau nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Diese basieren auf der konventionellen alkalischen Lyse von bakteriellen Zellen und der anschließenden Neutralisierung und Fällung von Zellproteinen, Membranbruchstücken sowie chromosomaler DNA. Die Plasmid-DNA, die sich im neutralisierten Überstand befindet, wird auf einer speziellen Hydroxyapatit-Säule gebunden und anschließend mit Isopropanol eluiert.

### **Restriktionsanalyse**

Der Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

---

1 µg	DNA
10 U <sup>1</sup> µg <sup>-1</sup>	Restriktionsenzym
1/10 Gesamtvolumen	Restriktionspuffer (10x)
Restvolumen	Bidest H <sub>2</sub> O

---

#### Summe der Volumina

1: Ein Unit entspricht der Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 µg λ-DNA innerhalb von 1 h bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 25 µl zu verdauen.

Dieser Ansatz wurde bei der für das jeweilige Restriktionsenzym angegebenen Temperatur für 2 Stunden inkubiert. Für analytische Zwecke reichte häufig der Verdau von 1 µg DNA. Es wurden von der verdauten DNA jeweils 100 bis 250 ng DNA, je nach Anzahl und Größe der erwarteten Banden, pro Geltasche aufgetragen. Für präparative Zwecke wurde je nach Bedarf mehr DNA eingesetzt und ein breiterer Kamm verwendet.

#### Ligationsansatz

Der Ansatz für die Ligation von zwei DNA Fragmenten war wie folgt zusammengesetzt:

250 ng	DNA Fragment 1
250 ng	DNA Fragment 2
1/10 Gesamtvolumen	Ligationspuffer (10x)
1,2 µl	T4 DNA Ligase
Restvolumen	H <sub>2</sub> O

---

#### Summe der Volumina

Die Ligationsreaktion wurde für 24 h bei 16°C durchgeführt. Erfolgte die Ligation von einem Insertionsfragment mit Vektor-DNA, so wurde letzterer zuvor dephosphoryliert, so daß eine Eigenligation bzw. ein Ringschluß des Vektors vermieden werden konnte. In diesem Fall wurde auch die Insertmenge in etwa zehnfachem Überschuß



eingesetzt.

### Dephosphorylierung von DNA-Enden

Zur Dephosphorylierung von Vektor-DNA wurde folgende Zusammensetzung verwendet:

1 µg	Vektor-DNA
1/10 Gesamtvolumen	CIP Puffer (10x)
1 µl	CIP (Roche Diagnostics)
Restvolumen	H <sub>2</sub> O

---

Summe der Volumina

Dieser Ansatz wurde zunächst für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde erneut 1 µl CIP zugesetzt und für eine weitere halbe Stunde weiterinkubiert.

### Klenow-Fill

Zum Auffüllen von einzelsträngigen DNA-Enden, die z.B. beim Verdau der DNA mit bestimmten Enzymen, die klebrige Enden erzeugen, entstehen, kann man die DNA mit dem Klenow-Enzym behandeln. Dazu wurden DNA, dNTPs und das Enzym in folgender Zusammensetzung in den Reaktionsansatz gegeben:

1 µg	DNA
1/100 Gesamtvolumen	BSA Lösung (10 mg ml <sup>-1</sup> )
3 U <sup>1</sup> pro 5 µl Gesamtvolumen	Klenow-Enzym (2 U <sup>1</sup> µl <sup>-1</sup> ) (Roche Diagnostics)
1/100 Gesamtvolumen	dNTPs (1 mmol l <sup>-1</sup> Endkonzentration)
Restvolumen	H <sub>2</sub> O

---

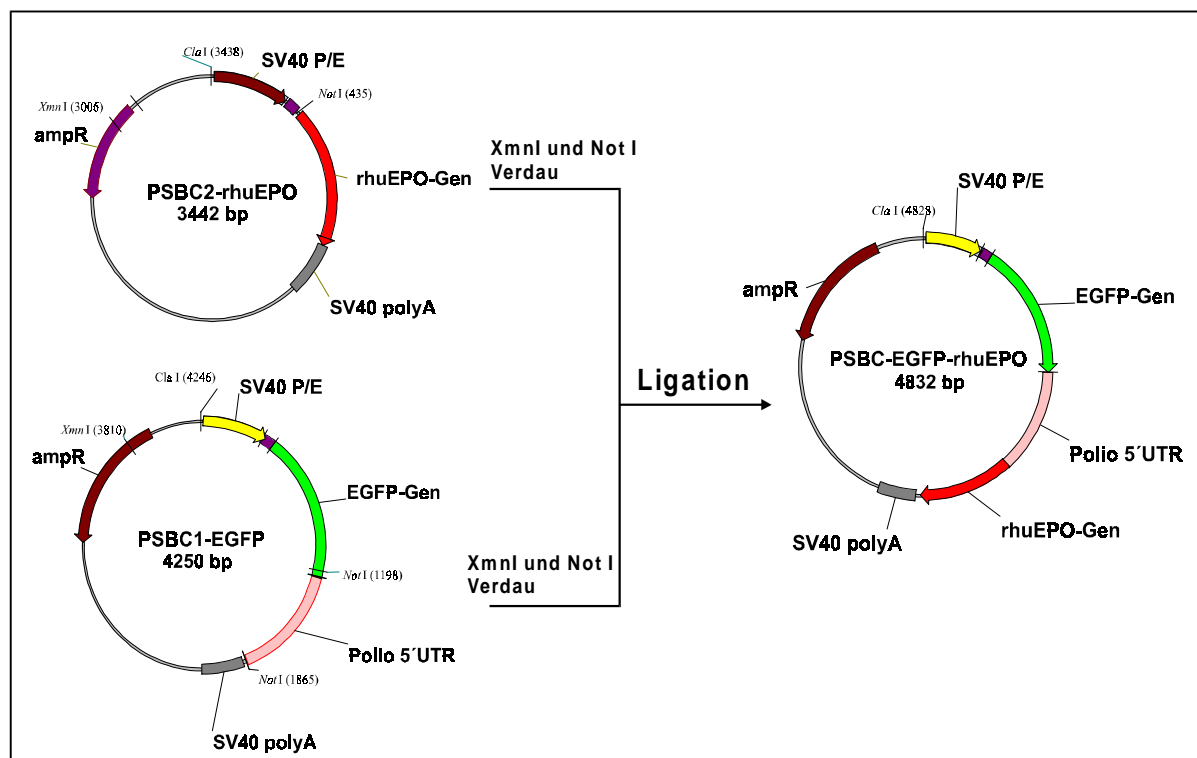
Summe der Volumina

1: Ein Unit Klenow-Enzym baut 10 nmol Nukleotide in eine säure-präzipitierbare Fraktion innerhalb von 30 min bei 37°C unter den vom Hersteller vorgegebenen Reaktionsbedingungen ein.

Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Es besteht auch die Möglichkeit, den Verdau sowie den Klenow-Fill in einem Reaktionsschritt auszuführen. Dazu wurden diesem Ansatz sowohl der Restriktionspuffer als auch das entsprechende Restriktionsenzym hinzugesetzt.

## 2.8.2 Konstruktion eines bicistronischen Vektors mit rhuEPO und EGFP als Reporterprotein

Der bicistronische Vektor pSBC-EGFP-rhuEPO setzt sich außer den üblichen Elementen wie Promoter, poly-Adenylierungsstelle und multiple Klonierungsstelle im Wesentlichen aus zwei zu exprimierenden Genen und einem dazwischen geschaltetem IRES-Element zusammen, an dem bei der Translation ein weiteres



**Abb. 2.8.2:** Konstruktion des Plasmids pSBC-EGFP-rhuEPO aus den zwei Plasmiden pSBC-1-EGFP und pSBC-2-rhuEPO. Nach der Restriktion beider Vektoren wurde von jedem Plasmid das Fragment, das die Gene für den bicistronischen Vektor enthielt, zur Ligation weiterverwendet. Da sich im EGFP-Gen eine NotI Schnittstelle befand, wurde mit diesem Enzym nur partiell verdaut und das Fragment mit dem intakten EGFP-Gen weiterverwendet.

Ribosom andocken und die Translation des zweiten Gens im Cistron initiieren kann. Das Plasmid wurde aus zwei Teilfragmenten zusammengesetzt, die jeweils von dem Plasmid pSBC-1-EGFP und pSBC-2-rhuEPO stammten.

#### **2.8.2.1 Konstruktion des Plasmids pSBC-1-EGFP**

Die Plasmide pSBC-1 sowie pSBC-2 wurden von der Abteilung Genregulation und Differenzierung der GBF zur Verfügung gestellt (Dirks et al., 1993). Das pSBC-1 Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen SmaI und EcoRI in der multiplen Klonierungsstelle geschnitten. Das Plasmid pEGFP-1 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, USA, Genbank Accession No. U55761) mit dem Reportergen EGFP wurde zunächst mit dem Enzym NotI geschnitten. Das sich ergebende einzelsträngige klebrige Ende an der NotI Schnittstelle wurde mit dem Klenow-Fragment zu einem stumpfen doppelsträngigem Ende aufgefüllt. Das Plasmid wurde anschließend mit EcoRI erneut verdaut. Das entstehende ca. 800 bp Fragment wurde in das geschnittene pSBC-1 Plasmid hineinligiert. Dabei konnte das stumpfe Ende der SmaI Schnittstelle mit der aufgefüllten NotI Schnittstelle zusammenligieren. Aus dieser Ligation entsteht das pSBC-1-EGFP Plasmid.

#### **2.8.2.2 Konstruktion des Plasmids pSBC-2-rhuEPO**

Das rhuEPO-Gen wurde zunächst mit einem EcoRI Verdau aus dem pCR-3-EPO Plasmid, das von Eckhard Grabenhorst (GBF, Protein-glycosylierung) zur Verfügung gestellt worden war, herausgeschnitten. Das ca. 584 bp große Fragment, das das rhuEPO-Gen einschließt, wurde in das ebenfalls mit EcoRI linearisierte pSBC-2 Plasmid durch Ligation eingefügt. Der Ligationsansatz wurde anschließend in *E.coli*-Zellen transformiert. Es wurden einige Klone gepickt und auf die richtige Insertionsrichtung hin untersucht. Dazu wurden die Minipräparationen mit dem Enzym StuI verdaut. Klone, die das rhuEPO Gen in der richtigen Orientierung eingefügt hatten, zeigten ein 610 bp Fragment, während bei falscher Orientierung sich ein nur 100 bp großes Fragment aus dem Plasmid löste.

#### **2.8.2.3 Konstruktion des Vektors pSBC-EGFP-rhuEPO**

Zur Konstruktion des bicistronischen Vektors wurden die Plasmide pSBC-1-EGFP

sowie pSBC-2-rhuEPO mit den Enzymen XmnI und NotI verdaut (s. Abb. 2.8.2). Der Verdau mit NotI erfolgte partiell, da sich außer im Vektor auch in dem EGFP Gen eine Schnittstelle befand. Die jeweils richtigen Fragmente, die die unversehrten zu exprimierenden Gene enthielten, wurden mit Hilfe eines präparativen Gels getrennt und isoliert. Die richtigen Fragmente wurden anschließend wieder in einer Ligation zusammengesetzt.

### 2.8.3 Transformation

Zur Einführung von Fremd-DNA in ein bakterielles Expressionssystem wurde die Methode der Elektroporation verwendet. Dazu wurden kompetente *E.coli* Zellen, die bei -70°C eingefroren waren, langsam auf Eis aufgetaut. 1 µl einer Plasmidlösung, die ausreichend DNA enthielt (bei reinen Plasmiden reichen 1 ng DNA, bei Ligationsansätzen wird deutlich mehr DNA benötigt), wurde in einem Eppendorfgefäß (Eppendorf) vorgelegt. Aus der aufgetauten Zellsuspension wurden 50 µl in das Eppendorfgefäß gegeben, vorsichtig resuspendiert und das Gemisch in eine eiskalte Elektroporationsküvette (2 cm, BioRad, München) überführt. Anschließend erfolgte die Transformation mit dem Gene-Pulser II und dem Pulse Controller (beide BioRad, München). Dazu wurden folgende Parameter eingestellt: Kapazität: 500 µF, Widerstand: 200 Ω, Spannung: 2,5 kV. Die Zeitkonstante, bei der die Transformation erfolgte, sollte zwischen 4 und 4,5 ms liegen. Sofort im Anschluß an die Elektroporation wurden die Zellen mit 500 µl SOC Medium versetzt. Die Suspension wurde in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und 30 Minuten unter leichtem Schütteln im Eppendorf Inkubator (Eppendorf, Hamburg) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der Zellsuspension auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der Ampicillinplatten wurde eine Transformation mit reinem Wasser durchgeführt. Entstanden auf der Agarplatte bei dieser Kontrolle dennoch Zellklone, so war das Ampicillin im Medium zerfallen. Als Positivkontrolle wurde eine Transformation mit einem bekannten, intakten Plasmid, z.B. pBR322, ausgeführt. Kamen hierbei keine Klone hervor, war die Transformation nicht erfolgreich.

### 2.8.4 Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion der tierischen Zellen erfolgte nach einer modifizierten Calciumphosphat-Methode von Maitland und McDougall (1977). 24 Stunden vor der Transfektion wurden  $3 \times 10^5$  Zellen in eine T-25 Zellkulturflasche inokuliert. Vier Stunden vor der Transfektion wurde ein Medienwechsel mit im Brutschrank aufgewärmtem und äquilibriertem Medium durchgeführt. Zur Herstellung des Plasmid Calciumphosphat-Copräzipitates wurden jeweils 500 ng des Selektionsplasmids mit 5000 ng der Transfer-Plasmid-DNA zusammengegeben. Zur besseren Präzipitatbildung sowie für eine bessere Integration in das Genom wurden außerdem jeweils 8 µg chromosomale CHO-DNA als Carrier-DNA hinzugegeben. Zu dieser DNA-Mischung wurden 25 µl einer sterilen  $2,5 \text{ mol l}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  Lösung pipettiert und mit sterilem Wasser auf 250 µl aufgefüllt. In einem 10 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc) wurden 250 µl einer doppelt konzentrierten HEBS-Pufferlösung ( $280 \text{ mmol l}^{-1}$  NaCl,  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  KCl,  $1,5 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Merck),  $12 \text{ mmol l}^{-1}$  Dextrose (Merck),  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  HEPES (Sigma) vorgelegt und die Calciumchlorid-DNA-Lösung langsam unter ständigem Schütteln (Vortex Genie 2) bei sterilen Bedingungen hinzupipettiert. Nach 30 bis 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die gebildeten Präzipitate auf die Zellen getropft. Überschüssige Präzipitate wurden nach einer Übernachtinkubation im Brutschrank durch einen Medienwechsel entfernt. Die Zellen wurden 48 Stunden später zur Selektion auf eine Zellkulturpetrischale (Nunc) umgesetzt und mit Selektionsmedium gefüttert. Das verbrauchte Medium sowie tote, abgelöste Zellen wurden alle zwei Tage durch einen Medienwechsel entfernt. Nach ca. 10 Tagen wurden die ersten Klone sichtbar. Mit Hilfe einer P10-Pipettenspitze wurden die Klone gepickt und in 96-Loch-Platten kultiviert.

### 2.8.5 Northern Blot Analyse

#### 2.8.5.1 RNA Isolierung mit dem RNeasy Kit und Gelelektrophorese

Zur Analyse von polyA-plus mRNA wurde zunächst eine Gesamt-RNA Isolierung durchgeführt. Dazu wurde ein kommerziell erhältlicher Kit, RNeasy (Qiagen, Hilden) verwendet. Pro Klon wurde eine konfluente, T-75 Zellkulturflasche mit ca.  $3 \times 10^7$  Zellen

verwendet. Die RNA-Isolierung erfolgte nach Vorschrift des Herstellers unter RNase freien Bedingungen. Die Konzentration des aufgereinigten polyA-plus RNAs wurde durch Extinktionsmessungen bei 260 nm festgelegt. Dazu wurde der Absorptionswert bei 260 nm mit 40 multipliziert. Ein hohes Verhältnis der Extinktionswerte bei 260 und 280 nm deutete auf einen hohen Reinheitsgrad der Probe hin. Pro Probe wurden 10 µg RNA auf einem 1,2 %-igem Formaldehyd-Gel nach Sambrook et al. (1989) aufgetragen und 3,5 h bei  $6 \text{ V cm}^{-1}$  elektrophoriert. Zur Orientierung wurden 3,5 µl ( $1 \text{ µg µl}^{-1}$ ) eines RNA-Standards von 0,24 bis 9,5 kb (Gibco-BRL) ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

#### **2.8.5.2 Transfer der RNA auf einem Hybond N Filter**

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel unter UV-Belichtung fotografiert. Die ribosomale RNA ließ deutlich zwei Banden erkennen, während die mRNA einen kaum sichtbaren kontinuierlichen Verlauf über die gesamte Laufstrecke des Gels aufwies. Im Anschluß daran wurde das Gel nach Sambrook et al. (1989) auf einen Hybond-N Filter (Amersham) geblottet. Die auf die Membran übertragenen RNA Moleküle wurden durch eine UV-Belichtung ( $1200 \text{ µJ cm}^{-2}$ , UV Stratalinker 2400, Stratagene, La Jolla) mit der Membran kovalent gekoppelt und damit permanent fixiert.

#### **2.8.5.3 Random Primer Herstellung der DNA-Sonden**

Zur Sondenherstellung wurde aus dem pCMVSHE-PYC2-Vektor ein geeigneter Abschnitt des PYC2-Gens ausgesucht und mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI und NsiI aus dem Gen entfernt. Das 635 bp lange BamHI/NsiI Fragment wurde präparativ aufgetrennt und aus dem Gel isoliert. Anschließend wurde es nach Vorschrift des Herstellers mit Hilfe eines Quiaquick Spin Columns (Qiagen) aufgereinigt. Die DNA Konzentration des aufgereinigten Fragments wurde nach der Gelelektrophorese mit Hilfe eines  $\lambda$ -DNA-Standards (Abteilung Genregulation und Differenzierung) bekannter Konzentration abgeschätzt. Im Anschluß daran wurden 25 ng davon für die radioaktive Markierung des Genabschnitts eingesetzt. Die DNA wurde vor der Reaktion 2 Minuten in einem Eppendorfgefäß bei  $95^{\circ}\text{-}100^{\circ}\text{C}$  denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Die Reaktionsmischung bestand, wenn nicht anders vermerkt, aus dem Random Prime kit von Promega (Madison, USA):

---

15 µl	denaturiertes DNA Fragment (=25 ng)
18 µl	H <sub>2</sub> O
14 µl	Reaktionsmix
5 µl	[ $\alpha^{32}$ -P] dATP (Amersham, 1,85 MBq, 10 <sup>5</sup> GBq mmol <sup>-1</sup> )
1 µl	Klenow-Enzym (5 U, Definition von U s. 2.8.1.2)

---

53 µl Gesamtvolumen

Der Reaktionsmix setzte sich wie folgt zusammen:

15 µl	Labelling Puffer (5x)
3x2 µl	kalte dNTPs (jeweils 20 µmol l <sup>-1</sup> )
2 µl	BSA Lösung (400 µg ml <sup>-1</sup> )

---

Summe der Volumina

Die Reaktion wurde für 30 Minuten bei 37°C ausgeführt. Anschließend wurde die gesamte Reaktionsmischung auf einer Pharmacia NAP<sup>TM</sup>-5 Säule (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Schweden) von unreaktierten dNTPs befreit. Dazu wurde die Reaktionsmischung mit den folgenden Substanzen versetzt: 50 µl Reaktionsmix, 50 µl TE-NaCl (pH 7,0), 2 µl EDTA (0,5 M), 2 µl Hering Spermien DNA (10 µg µl<sup>-1</sup>). Die Säule wurde zuvor mit 10 ml TE-NaCl Puffer äquilibriert. Anschließend wurden 100 µl der mit Spermien-DNA versetzten Reaktionsmischung auf die Säule gegeben und mit 4 ml TE-NaCl Lösung eluiert. Dabei wurden 8 Fraktionen zu je 500 µl aufgefangen. Aus den Eluaten wurden jeweils 5 µl mit 2 ml Scintillationscocktail (Rotiszint, Carl Roth KG, Karlsruhe) versetzt und im Scintillationsmeßgerät (Beckman Instruments) vermessen. Die Säule hält niedermolekulare dNTPs zurück während Oligonukleotide leicht eluieren können. Die höchsten Oligonukleotidanteile waren in den Fraktionen 2 und 3 enthalten.

#### 2.8.5.4 Hybridisierung der RNA Blots

Die Hybridisierung der Northern Blots wurde nach der Vorschrift von Amersham für HYBOND-Nylon-Membranen ausgeführt. Die Vorhybridisierung erfolgte unter Schütteln für 2-4 Stunden bei 42°C. Pro Membran (10x13 cm) wurden 25 ml eines Vorhybridisierungsmixes (12,5 ml 20x SSPE oder 15 ml 20x SSC, 25 ml deionisiertes Formamid, 2,5 ml 100x Denhardt, 0,5 ml 10 % SDS, 0,25 ml denaturierte Hering Spermien-DNA (10 mg ml<sup>-1</sup>), 9,25 ml bidestilliertes H<sub>2</sub>O) eingesetzt. Zur Hybridisierung mit der DNA- oder RNA-Sonde wurden zunächst 10 ml aus dem Vorhybridisierungsansatz durch frische Vorhybridisierungslösung ersetzt und die radioaktive Sonde nach einer dreiminütigen Denaturierung bei 95°C zugesetzt. Die Blots wurden über Nacht bei 42°C inkubiert und anschließend in folgender Reihenfolge gewaschen:

1. 15 Minuten in 50 ml einer 6x SSC oder 5x SSPE Lösung bei 42°C
2. 30 Minuten in 50 ml einer 1x SSPE oder 2x SSC Lösung mit 0,1 % SDS bei 42°C
3. 15 Minuten in 50 ml einer 0,1x SSPE oder 0,2x SSC Lösung mit 0,1 % SDS bei Raumtemperatur

Die Blots wurden anschließend getrocknet und zur Autoradiographie auf einem Kodak BioMax Film (Eastman Kodak Co.) ca. 5 Tage bei -70°C gelagert.

Die Zusammensetzung für die Pufferlösungen war wie folgt:

20x SSPE:	3,6 mol l <sup>-1</sup> NaCl; 0,2 mol l <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,7; 0,002 mol l <sup>-1</sup> EDTA
20x SSC:	3,6 mol l <sup>-1</sup> NaCl; 88,2 g l <sup>-1</sup> Natriumcitrat; pH 7,0
100x Denhardt:	2 % BSA, 2 % Ficoll 400, 2 % Polyvinylpyrrolidon (Lagerung bei -20°C)



---

## **3 Ergebnisse**

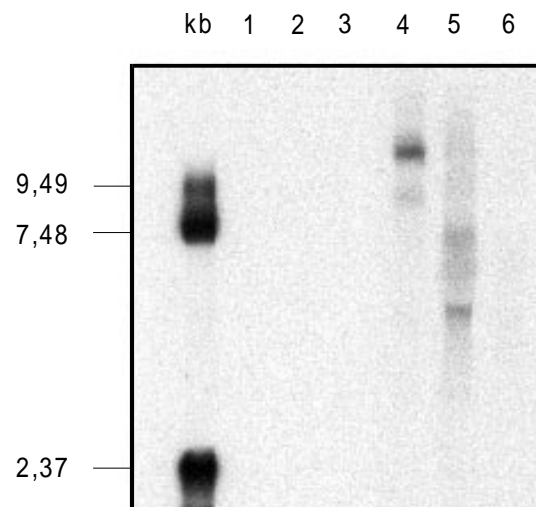
### **3.1 Einführung der Hefe-Pyruvat-Carboxylase in BHK-Zellen durch Transfektion**

#### **3.1.1 Transfektion und Selektion**

Für die Untersuchung des Einflusses der Hefe-Pyruvat-Carboxylase auf den Metabolismus von Zellen ist es notwendig, eine Zelllinie mit stabiler Expression der PYC2 zu erzeugen. Es ist ebenfalls wichtig eine geeignete Kontrollzelllinie zu finden. Für die Ausführung der Transfektionsexperimente wurde eine BHK-21A Zelllinie in zwei Kulturen aufgeteilt. Eine Kultur wurde mit dem Plasmid pAG60, das eine Geneticin Resistenz (GBF, Abteilung Genregulation und Differenzierung) trägt, transfiziert. Eine weitere Kultur wurde mit dem Plasmid pCMVSHE-PYC2 und pAG60 cotransfiziert. Aus beiden Transfektionen wurden nach der Selektion etwa 20 verschiedene Einzelklone nach Zufall gepickt und weiterkultiviert bis ausreichende Zellzahlen zum Einfrieren der Zellklone zur Verfügung standen. Aus der Transfektion mit dem Plasmid pAG60 wurde zusätzlich eine Mischkultur aus allen hervorgegangenen Zellklonen weiterkultiviert. Diese Klonmischung diente als Kontrolle bei allen Experimenten, falls es nicht ausdrücklich anders erwähnt wurde. Da sowohl die mit dem pCMVSHE-PYC2 Plasmid transfizierten Zellen als auch die Kontrolle eine Geneticin Resistenz enthielten, konnten beide Zelllinien in geneticinhaltigem Medium kultiviert werden. Auf diese Weise wurden Unterschiede aufgrund verschiedener Medienbedingungen vermieden. Für die Untersuchung der Expression der Hefe-Pyruvat-Carboxylase (PYC2) sowie der metabolischen Charakteristika wurden einige Zellklone aus dem Pool der eingefrorenen Klone nach Zufall ausgewählt.

#### **3.1.2 Überprüfung der PYC2-Expression in selektierten Zellklonen**

Nach der Transfektion und Selektion von stabilen Transfektanten sollte überprüft werden, ob die Expression des PYC2 Gens erfolgreich war. Dazu wurde zunächst



**Abb. 3.1.2.1** Northern Blot Analyse der Hefe-Pyruvat-Carboxylase von der Gesamt-RNA verschiedener BHK-21 PYC2 Klone sowie Kontrollklonen. Außen links: RNA Leiter (0,24-9,5 kb). **1:** BHK-21 A Kontrollklon 1, **2:** Kontrollklon 2, **3:** BHK-21 Kontrolle Klonmischung, **4:** BHK-21 PYC2 Klon 10, **5:** BHK-21 PYC2 Klon 15, **6:** BHK-21 PYC2 Klon 20. Die Kontrolle zeigte keine Hybridisierung mit der Bande, was für eine hohe SONDENSPEZIFITÄT GEGEN DIE PYC2 SPRICHT. Die Expression der PYC2 in den Klonen ist sowohl in der Quantität als auch der Transkriptlänge unterschiedlich.



**Abb. 3.1.2.2** Western Blot Analyse von Pyruvat-Carboxylase in unterschiedlichen BHK-21 Zellklonen mit und ohne PYC2-Expression. **Links:** Außen links: Molekulargewichtsstandard, **1:** Rinder-PC Standard (~130 kDa), **2:** BHK-21 PYC2 Klon 36, **3:** BHK-21 PYC2 Klon 1, **4:** BHK-21 PYC2 Klon 14, **5:** BHK-21 PYC2 Klonmischung, **6:** BHK-21A Kontrolle, **7:** BHK-21A untransfizierter Wildtyp. **Rechts:** **1:** Rinder-PC Standard, **2:** BHK-21 PYC2 Klon 10, **3:** BHK-21 PYC2 Klon 15, **4:** BHK-21 PYC2 Klon 20, **5:** BHK-21A Kontrolle.

die Genexpression auf der mRNA Ebene untersucht und anschließend die Translation mit Hilfe von Western Blots untersucht. Schließlich wurde auch die Aktivität der Pyruvat-Carboxylase bestimmt.

#### **3.1.2.1 Überprüfung der Genexpression durch Northern Blot Analyse**

Für die Northern Blot Analyse wurden vier mit dem pCMVSHE-PYC2 Plasmid transfizierte Klone (BHK-21 PYC2 Klone) sowie einige Kontrollzellklone ausgewählt. Die PYC2-Expression ließ sich in den untersuchten BHK-21 PYC2 Klonen deutlich nachweisen (s. Abb. 3.1.2.1) Es konnten Transkripte von unterschiedlichen Längen und Konzentrationen detektiert werden. Eindeutige Banden waren bei 11,6 kb, 9,5 kb, 8,1 kb sowie 5,6 kb zu erkennen. Die erwartete Fragmentlänge war 3573 bp bzw. bei einem mitgerechnetem PolyA-Schwanz von ca. 200 bp Länge 3773 bp. Die Kontrollzellklone zeigten keine Hybridisierungsbanden, was für eine hohe Spezifität der Sonde gegen die Hefe-Pyruvat-Carboxylase spricht. Es kam zu keiner Kreuzreaktion mit dem nativen, mitochondrialen Pyruvat-Carboxylase (PC) Transkript bei den Kontrollzellen.

#### **3.1.2.2 Immunoblot Analyse von PYC2 transfizierten Zellklonen sowie Kontrollzellen**

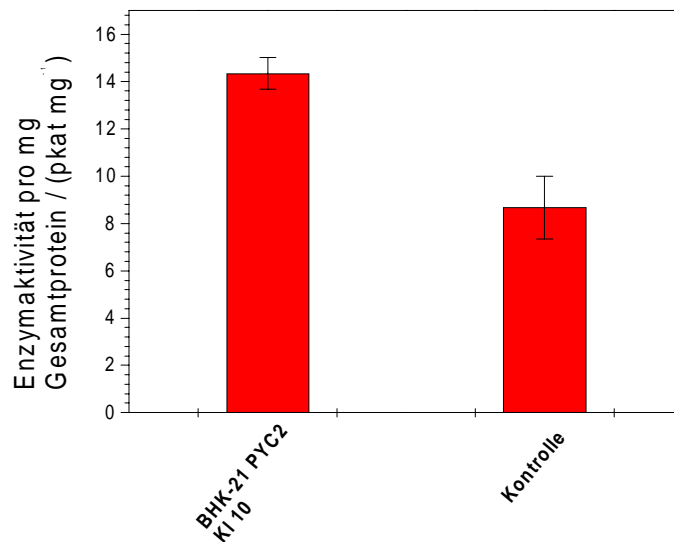
Für die Immunoblot Analyse wurden mehrere BHK-21 PYC2 Klone, die Kontrolle sowie untransfizierte Wildtyp BHK-21A Zellen untersucht. Zur Identifizierung der Bandengröße und als positive Kontrolle der Pyruvat-Carboxylase in den Blots wurde Rinder-PC als Standard verwendet. Dieser hat eine Molmasse zwischen 120 und 130 kDa (Utter et al., 1975) und liegt damit sehr nah bei der Hefe-Pyruvat-Carboxylase mit einer Molmasse von 120 kDa (Brewster et al., 1994). Es zeigte sich, wie erwartet, daß die einzelnen BHK-21 PYC2 Klone unterschiedliche Mengen der Pyruvat-Carboxylase exprimierten. Sowohl die Kontrolle als auch die Wildtypzellen (s. Abb. 3.1.2.2 links) wiesen ebenfalls eine Expression der Pyruvat-Carboxylase auf, die jedoch deutlich geringer war als in den PYC2 Klonen (s. Abb. 3.1.2.2 links und rechts). Da keine spezifisch gegen die Hefe-Pyruvat-Carboxylase gerichteten Antikörper verfügbar waren, wurde Peroxidase gekoppeltes Streptavidin verwendet, das alle biotinhaltigen Enzyme nachweist. Somit muß diese schwache Bande von der nativen,

mitochondrialen PC herrühren.

Die Blots zeigen, daß die meisten der mit PYC2 transfizierten Zellklone eine intensivere Pyruvat-Carboxylase Bande aufwiesen als die Kontrolle und der Wildtyp. Diese zusätzliche Expression von Pyruvat-Carboxylase ist auf die hineinklonierte PYC2 zurückzuführen.

### 3.1.2.3 Enzymaktivitätsbestimmungen

Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten standen verschiedene in der Literatur beschriebene Methoden zur Verfügung. Viele dieser Tests erwiesen sich jedoch für die Anwendung im Rohextrakt als ungeeignet, da sie für aufgereinigte Enzympräparationen konzipiert waren und Konkurrenzreaktionen, die in Rohextrakten auftreten, nicht berücksichtigen (Utter und Keech, 1963). Auch der in Rohextrakten für geeignet befundene Test mit dem Färbereagenz DTNB (Crabtree et al. 1972, Ballard and Hanson, 1967) erwies sich als wenig nützlich, da das Substrat - das CoA - für die kolorimetrische Nachweisreaktion mit dem DTNB durch verschiedene andere Reaktionen und spontane Konversionen des AcCoA zum CoA im Rohextrakt entstehen konnte. Aus diesem Grund mußte auf ein recht aufwendiges und kostspieliges Testverfahren von Atkin et al. (1979) zurückgegriffen werden. Für die PYC2 Zellen wurde ein repräsentativer BHK-21 PYC2 Klon ausgewählt und im Vergleich zur Kontrolle vermessen. Die Enzymaktivität für den repräsentativen Klon 10 betrug  $14,36 \pm 0,67$  pkat pro mg Protein. Die Kontrolle wies eine Enzymaktivität von  $8,68 \pm 1,32$  pkat  $\text{mg}^{-1}$  auf (s. Abb. 3.1.2.3). Mit Hilfe des empfindlichen Enzymtests mit radioaktiven Substraten konnte die zuvor in der Literatur nicht nachweisbare Aktivität von Pyruvat-Carboxylase in BHK-Zellen (Fitzpatrick et al., 1993, Petch und Butler, 1994, Neermann und Wagner, 1996, Vriezen, 1998) quantifiziert werden. Die Differenz der Pyruvat-Carboxylase Enzymaktivitäten zwischen der Kontrolle und dem PYC2 Klon ist auf die Hefe-Pyruvat-Carboxylase zurückzuführen, die im BHK-21 PYC2 Klon 10 zusätzlich zum mitochondrialen Enzym zur Pyruvatkonversion beiträgt.



**Abb. 3.1.2.3** Pyruvat-Carboxylase Enzymaktivität für den repräsentativen BHK-21 PYC2 Klon 10 und der Kontrolle. Die Enzymaktivitäten sind auf die Gesamtproteinmenge normiert.

## 3.2 Parameter zur Beurteilung der Wirkung von Hefe-Pyruvat-Carboxylase

Zur Überprüfung, ob die erwünschten Verbesserungen des Stoffwechsels durch die Hefe-Pyruvat-Carboxylase eintreten, wurden einige stoffwechselspezifische Parameter untersucht. Dabei gibt es einige direkte, so z.B. die Substratfluxanalyse, sowie indirekte Indikatoren für einen verbesserten oxidativen Substratabbau, wie beispielsweise die Substratverbrauchsrate. In dieser Arbeit wurden Substratfluxe, Substratverbrauch bzw. Endproduktbildung sowie Sauerstoffverbrauchsrate untersucht. Außerdem wurden die Nukleotidpools der Zellen beobachtet.

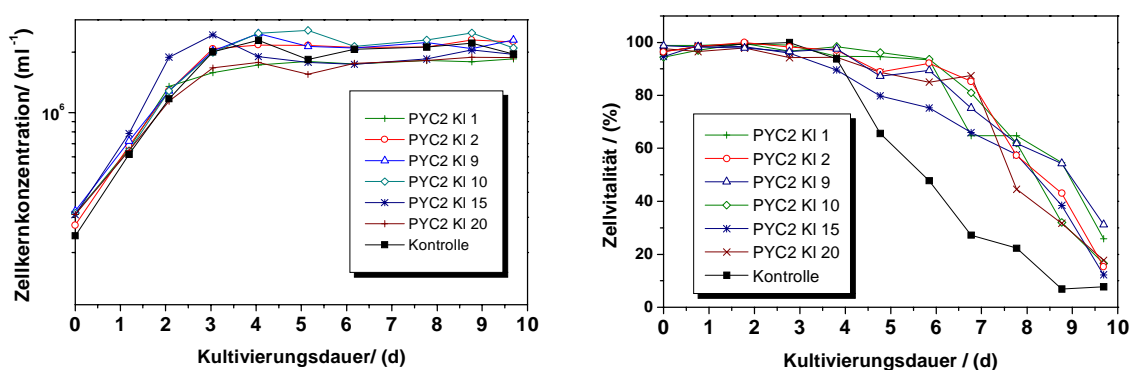
### 3.2.1 Wachstum und metabolische Substratverbrauchsrate in Batchkulturen - ein Vergleich zwischen verschiedenen BHK-21 PYC2 Klonen und einer Klonmischung von Kontrollzellen

Zur Untersuchung des Einflusses von Hefe-Pyruvat-Carboxylase auf den Stoffwechsel der Zellen wurden verschiedene BHK-21 PYC2 Klone mit einer Kontrolle im Hinblick

auf das Wachstum und die Substratverbrauchsraten verglichen. Die Kontrolle bestand aus einer Mischung von verschiedenen Geneticin-resistenten Zellklonen. Diese Versuche in Satzkultur (Batchkultur) wurden vier Mal wiederholt, um diesen Vergleich statistische Aussagekraft zu geben. Da die Ergebnisse bei allen vier Versuchen vergleichbar waren, wurde ein Versuch repräsentativ dargestellt.

### 3.2.1.1 Vergleich des Wachstumsverhaltens

Die Wachstumsraten in allen untersuchten Kulturen waren mit  $\mu = 0,7 \text{ d}^{-1}$  vergleichbar. Wie die Darstellung in Abbildung 3.2.1.1 zeigt, hatte die Expression der PYC2 in den Zellen weder einen Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit noch auf die maximal

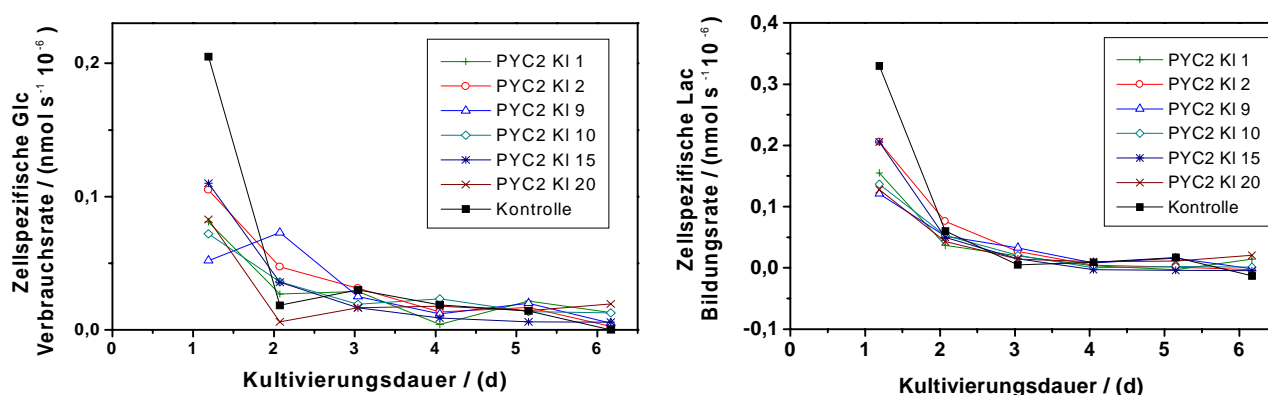


**Abb. 3.2.1.1** Verlauf der Zellkernkonzentrationen (links) und der Zellvitalität (rechts) in einer Batchkultur. Vergleich zwischen der Kontrollkultur und den BHK-21 PYC2 Klonen. Die Wachstumsraten sowie die maximal erreichbaren Zellzahlen sind in allen Kulturen etwa identisch. Die Vitalität der Zellen im Laufe der Kultivierung unterscheidet sich deutlich bei der Kontrolle von den restlichen BHK-21 PYC2 Klonen. Die Kontrollkultur geht 2-3 Tage vor den PYC2 exprimierende Kulturen in die Absterbephase über.

erreichbare Zellkonzentration in den Batchkulturen. Deutliche Unterschiede waren jedoch erkennbar für die Zellvitalität. Während die Kontrollkultur bereits nach vier Tagen in die Absterbephase übergang, dauerte es bei den PYC2 Vergleichskulturen weitere 2-3 Tage, bis sie in die Sterbephase gelangten. Für die PYC2 exprimierende Kultur konnte eine hohe Zellvitalität über einen verlängerten Zeitraum aufrecht erhalten werden.

### 3.2.1.2 Zellspezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatproduktionsraten

Für die Berechnung der Substratverbrauchsrate wurde die frühe exponentielle Wachstumsphase, bis etwa 24 h nach Beimpfen der Kulturen, herangezogen, da die Verbrauchsrate am Anfang der Kultivierung maximal waren und im Laufe der Kultivierung, mit dem Erschöpfen der Nährsubstrate im Medium, abnahmen (Ljunggren und Häggström, 1994, Fitzpatrick et al., 1993). Weiterhin ist die Zusammensetzung des Mediums zu Anfang der Kultivierung in allen Kulturen recht einheitlich. Im Laufe der Kultivierung treten Veränderungen im Kulturmedium auf, die zu konzentrationsbedingten Veränderungen in Substrataufnahme und Substratverbrauchsrate führen (Zielke et al., 1984). Damit werden die Verbrauchsrate nicht nur abhängig von den Zelleigenschaften, sondern auch von den Kulturbedingungen, was für einen Vergleich des Zellmetabolismus von genetisch veränderten Zellen mit Kontrollzellen nicht erwünscht war.



**Abb. 3.2.1.2** Zellspezifische Glucoseverbrauchs- (links) und Lactatbildungsrate (rechts) für BHK-21 PYC2 Klone sowie die Kontrollkultur. Die zellspez. Glucoseverbrauchsrate der Kontrolle liegt deutlich über die zellspez. Verbrauchsrate der BHK-21 PYC2 Klone. Im besten Fall konnte eine Verringerung des zellspez. Glucosebedarfs um den Faktor 4 erreicht werden. Die zellspez. Lactatbildungsrate waren bei den BHK-21 PYC2 Klone ebenfalls geringer.

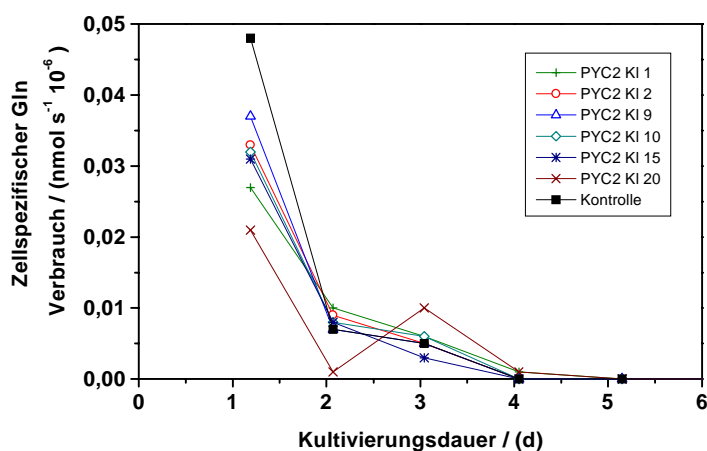
Die zellspezifischen Verbrauchsrate bezogen sich auf den Substratverbrauch pro eine Million Zellen. Sie lagen für Glucose zwischen 0,05 und 0,11 nmol s<sup>-1</sup> 10<sup>-6</sup> in den verschiedenen BHK-21 PYC2 Klone und bei 0,21 nmol s<sup>-1</sup> 10<sup>-6</sup> für die Kontrolle. Im

besten Fall, für den Klon 9, trat eine 4 fache Verringerung des zellspez. Glucosebedarfs ein (s. Abb. 3.2.1.2, links). Im Laufe der Kultivierung hatten einige Klone geringfügig höhere zellspez. Glucoseverbrauchsrate als die Kontrolle, was damit zu erklären ist, daß in den BHK-21 PYC2 Kulturen durch den geringeren anfänglichen Substratverbrauch eine höhere Glucosekonzentration im Medium verblieb und zu einer höheren zellspez. Glucoseaufnahme und -verbrauchsrate führte (s. Abb. 3.2.1.4). Die zellspez. Lactatbildungsrate verhielten sich analog zu den entsprechenden zellspez. Glucoseverbrauchsrate (s. Abb. 3.2.1.2, rechts). Kulturen mit hohem Glucosebedarf setzten ebenfalls hohe Mengen Lactat frei. Die zellspez. Lactatbildungsrate für die BHK-21 PYC2 Klone lagen zwischen  $0,12$  und  $0,21 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$ , während sie für die Kontrolle bei  $0,33 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  lagen. Im besten Fall konnte eine Verringerung der Lactatfreisetzungsrates um den Faktor 2,7 erreicht werden.

### 3.2.1.3 Zellspezifische Glutaminverbrauchsrate

Die zellspezifischen Glutaminverbrauchsrate für die BHK-21 PYC2 Kulturen waren analog zu den zellspez. Glucoseverbrauchsrate ebenfalls niedriger. Mit Werten zwischen  $0,021$  und  $0,037 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  lagen sie unterhalb der zellspez. Glutaminverbrauchsrate der Kontrollkultur, die einen Wert von  $0,048 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  aufwies (s. Abb. 3.2.1.3). Im besten Fall, bei BHK-21 PYC2 Klon 20, betrug die zellspez. Verbrauchsrate weniger als die Hälfte der Kontrolle. Es ist entscheidend, daß ein verringerter Glucoseverbrauch nicht durch einen überhöhten Glutaminverbrauch kompensiert wurde. Somit war der Gesamtsubstratbedarf bei den PYC2 Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen geringer.

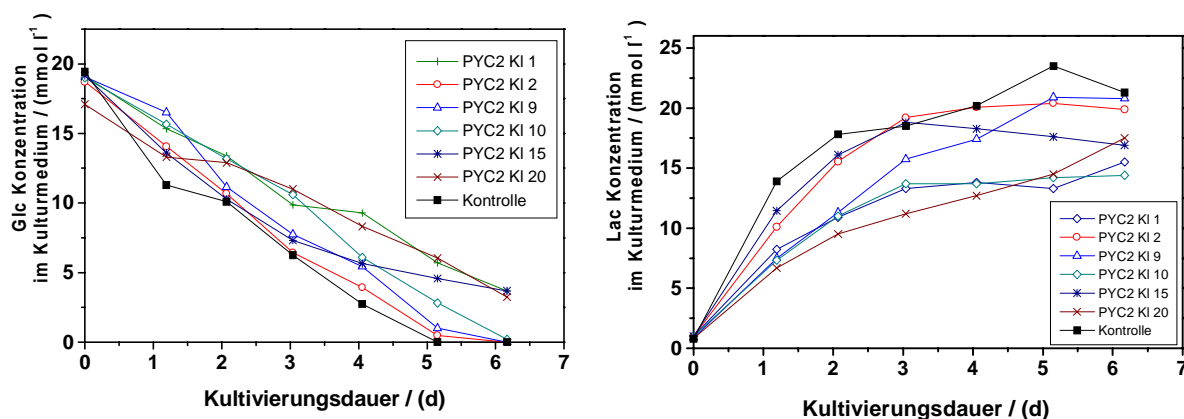


**Abb. 3.2.1.3**

Zellspezifische Glutaminverbrauchsrate für verschiedene BHK-21 PYC2 Klone sowie die Kontrollkultur. Alle BHK-21 PYC2 Klone zeichnen sich durch niedrigere zellspezifische Glutaminverbrauchsrate als die Kontrollkultur aus. Im besten Fall, für den Klon 20, lag der Verbrauch bei weniger als die Hälfte.

### 3.2.1.4 Verbleibende Glucose- und Lactatkonzentrationen im Medium

Der Verlauf der Glucosekonzentration im Kulturmedium über die Kultivierungsdauer zeigt, daß die Glucose in der Kontrollkultur bereits nach 5 Tagen erschöpft war, während der Glucosevorrat der BHK-21 PYC2 Klone weitere 1 bis 2 Tage ausreichte (s. Abb. 3.2.1.4). Die Lactatkonzentration stieg in der Kontrollkultur am steilsten an und erreichte schließlich mit 22 mmol l<sup>-1</sup> am Ende des Experiments die höchste Konzentration im Vergleich zu allen Kulturen.



**Abb. 3.2.1.4** Verlauf der Glucose- und Lactatkonzentrationen im Kulturmedium für eine Batchkultivierung.

### **3.2.2 Vergleich zwischen BHK-21 PYC2 Klonen und einzelnen Klonen der Kontrollkultur**

Die im Abschnitt 3.2.1 dargestellten Batchversuche mit BHK-21 PYC2 Klonen und einer Kontrollkultur wurden etwas modifiziert und erneut ausgeführt. Um darzulegen, daß es sich bei den Verbesserungen der metabolischen Eigenschaften für die BHK-21 PYC2 Klone nicht lediglich um einen Klonierungseffekt handelte, wurden diesmal für die Kontrolle ebenfalls verschiedene Klone verwendet. Es wurden im folgenden vier BHK-21 PYC2 Klone, fünf Kontrollklone und die Kontrolle bestehend aus einer Klonmischung untersucht und miteinander verglichen.

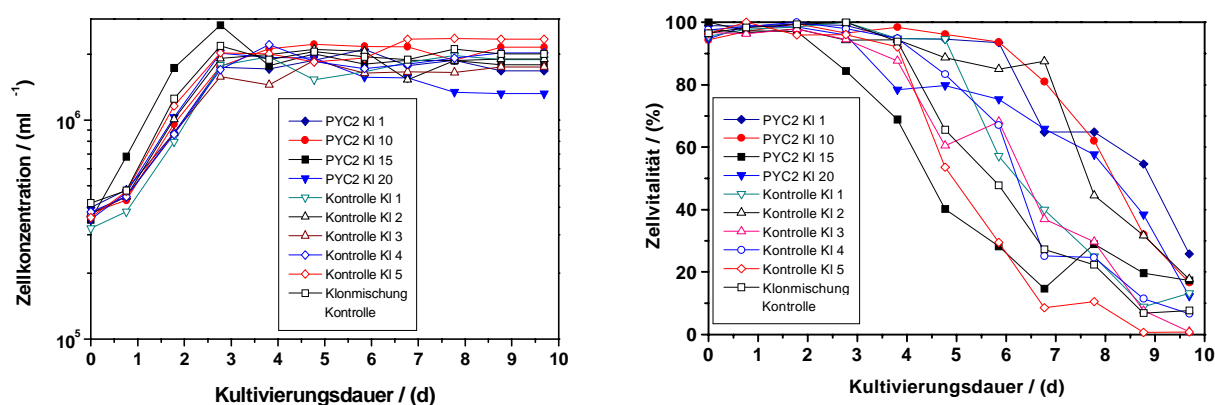
#### **3.2.2.1 Vergleich des Wachstumsverhaltens**

Die verschiedenen BHK-21 PYC2- sowie die Kontrollklone, mit Ausnahme von einem einzigen Klon, befanden sich zunächst in einer Adaptationsphase von ungefähr einem Tag. Danach folgte das exponentielle Wachstum mit Wachstumsraten zwischen 0,62 und 0,72 d<sup>-1</sup>. Die maximal erreichten Zellkernkonzentrationen am Ende der exponentiellen Phase bewegten sich zwischen 1,58x10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> (Kontrollklon 3) und 2,71 x 10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> (BHK-21 PYC2 Klon 15) (s. Abb. 3.2.2.1, links). Im gesamten Durchschnitt erreichten die BHK-21 PYC2 Klone eine mittlere maximale Zellkernkonzentration von 2,05x10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> gegenüber 1,86x10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> für die Kontrollklone. Die Vitalität der Zellen verhielt sich ähnlich wie in den vorhergehenden Batchversuchen. Die meisten Kontrollkulturen (offene Symbole) gingen nach vier Tagen in die Absterbephase über. Die BHK-21 PYC2 Klone (gefüllte Symbole) hatten insgesamt eine längere Phase vergleichsweise hoher Zellvitalität (s. Abb. 3.2.2.1, rechts).

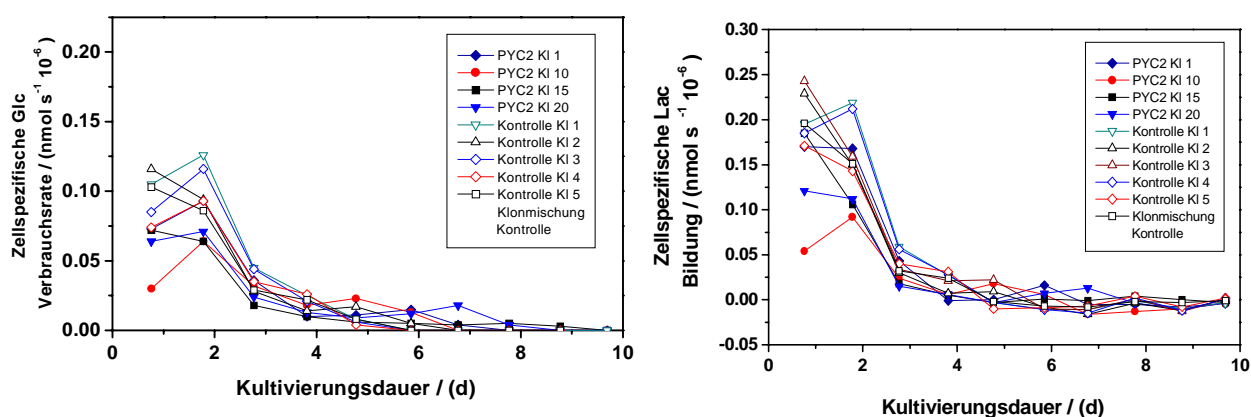
#### **3.2.2.2 Zellspezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatproduktionsraten**

Die zellspezifischen Glucoseverbrauchsrate lagen für alle BHK-21 PYC2 Klone niedriger als für die Kontrollklone (s. Abb. 3.2.2.2, links). Für einige Klone war ein leichter Anstieg der zellspez. Verbrauchsrate nach ca. 2 Kultivierungstagen zu beobachten. Dieser Anstieg der zellspez. Verbrauchsrate könnte auf die Adaptationsphase zu Beginn der Kultur zurückzuführen sein. Die zellspez. Lactatbildungsraten verliefen analog zu den jeweiligen zellspez. Glucose-

verbrauchsrate (s. Abb. 3.2.2.2, rechts). Die Kontrollklone bildeten deutlich mehr Lactat als die BHK-21 PYC2 Klone. Die günstigsten zellspez. Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten wies die PYC2 Klon 10 Kultur auf mit jeweils  $0,03$  bzw.  $0,054$   $\text{nmol s}^{-1} 10^{-6}$  zu Beginn der Kultivierung.



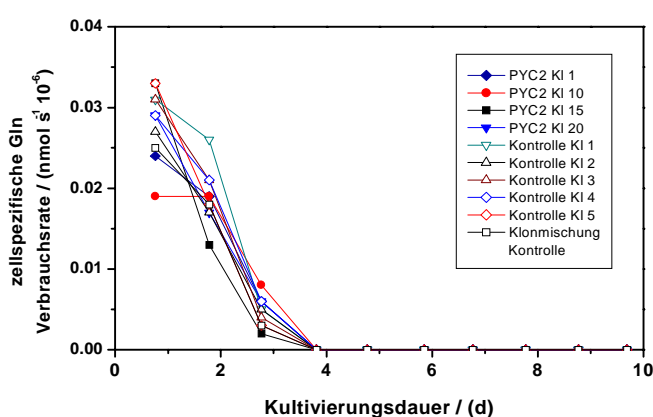
**Abb. 3.2.2.1** Zellkonzentration und Zellviabilität in Kulturen von BHK-21 PYC2 Klonen und verschiedenen Kontrollzellklonen.



**Abb. 3.2.2.2** Zellspezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten für verschiedene BHK-21 PYC2 (gefüllte Symbole) und Kontrollklone (offenen Symbole). Beide Raten liegen für die BHK-21 PYC2 Klone unterhalb der Kontrollkulturen.

### 3.2.2.3 Zellspezifische Glutaminverbrauchsrate

Die zellspez. Glutaminverbrauchsrate lagen zu Anfang der Kultivierung zwischen  $0,019$  und  $0,033 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  (s. Abb. 3.2.2.3). Die zellspez. Verbrauchsrate nahmen dann bis zum vierten Tag steil ab, was mit dem kontinuierlichen Erschöpfen des Mediums an Glutamin einherging. Für die BHK-21 PYC2 Klone zeigte sich, daß zwei von vier Klonen, Klon 1 und 10 deutlich geringere zellspez. Verbrauchsrate aufwiesen als alle Kontrollklone, während weitere zwei Klone, 15 und 20, im Bereich



**Abb. 3.2.2.3**

Zellspezifische Glutaminverbrauchsrate für verschiedene BHK-21 PYC2 Klone sowie Kontrollklone.

der Kontrollverbrauchsrate lagen. Die BHK PYC2 Klone 1 und 10 zeichneten sich durch die geringsten zellspez. Glutaminverbrauchsrate aus und hatten die längste Periode hoher Zellvitalität im Batch (s. Abb. 3.2.2.1 rechts). Eine Erklärung für die relativ hohe zellspez. Glutaminverbrauchsrate des BHK-21 PYC2 Klon 15 könnte ein erhöhter Bedarf an Energiequellen zu Anfang sein, da dieser Klon keine Adaptationsphase aufwies (s. Abb. 3.2.2.1 links).

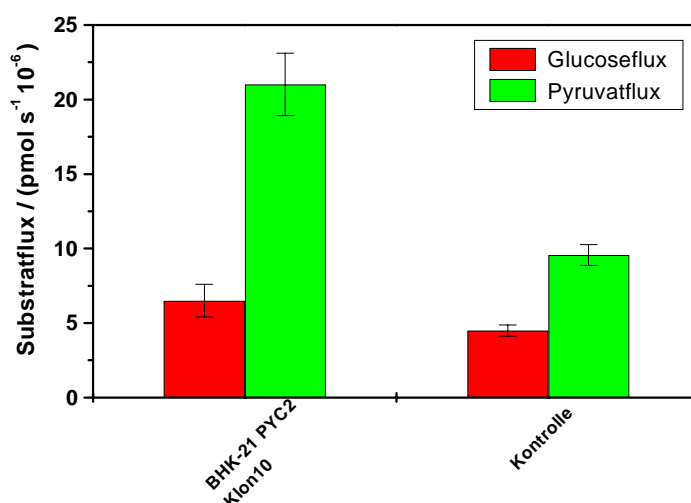
### 3.2.3 Intrazellulärer Flux radioaktiv markierter Substrate in den Citratcyclus

Als direkter Nachweis für einen erhöhten Fluß von Glucose in den Citratcyclus wurden intrazelluläre Fluxrate von  $^{14}\text{C}$ -markierten Substraten zu  $^{14}\text{CO}_2$  gemessen. Für diese Versuche wurde ein repräsentativer Klon, BHK-21 PYC2 Klon 10, ausgewählt und mit

der Mischklonkultur als Kontrolle verglichen.

### 3.2.3.1 Flux von $^{14}\text{C}$ -Glucose und $^{14}\text{C}$ -Pyruvat in den Citratcyclus

Der Flux von D-[6- $^{14}\text{C}$ ]-Glucose in den Citratcyclus betrug beim BHK-21 PYC2 Klon 10  $6,5 \pm 1,1 \text{ pmol min}^{-1} 10^{-6}$  (s. Abb. 3.2.3.1). Die Kontrollkultur metabolisierte  $4,5 \pm 0,38 \text{ pmol min}^{-1} 10^{-6}$  Glucose zu  $\text{CO}_2$ . Gegenüber der Kontrolle trat eine Verbesserung um einen Faktor von 1,4 auf. Der Flux von [1- $^{14}\text{C}$ ]-Pyruvat in den Citratcyclus für BHK-21 PYC2 Klon 10 war mit  $21,01 \text{ pmol min}^{-1} 10^{-6}$  mehr als doppelt so hoch wie der der Kontrolle mit  $9,57 \text{ pmol min}^{-1} 10^{-6}$ .



**Abb. 3.2.3.1** Fluxraten von D-[6- $^{14}\text{C}$ ]-Glucose und [1- $^{14}\text{C}$ ]-Pyruvat in den Citratcyclus. Dargestellt sind die Fluxraten für einen repräsentativen BHK-21 PYC2 Klon sowie die Kontrolle.

### 3.2.4 Wachstum und metabolische Substratverbrauchsraten in kontinuierlichen Kulturen

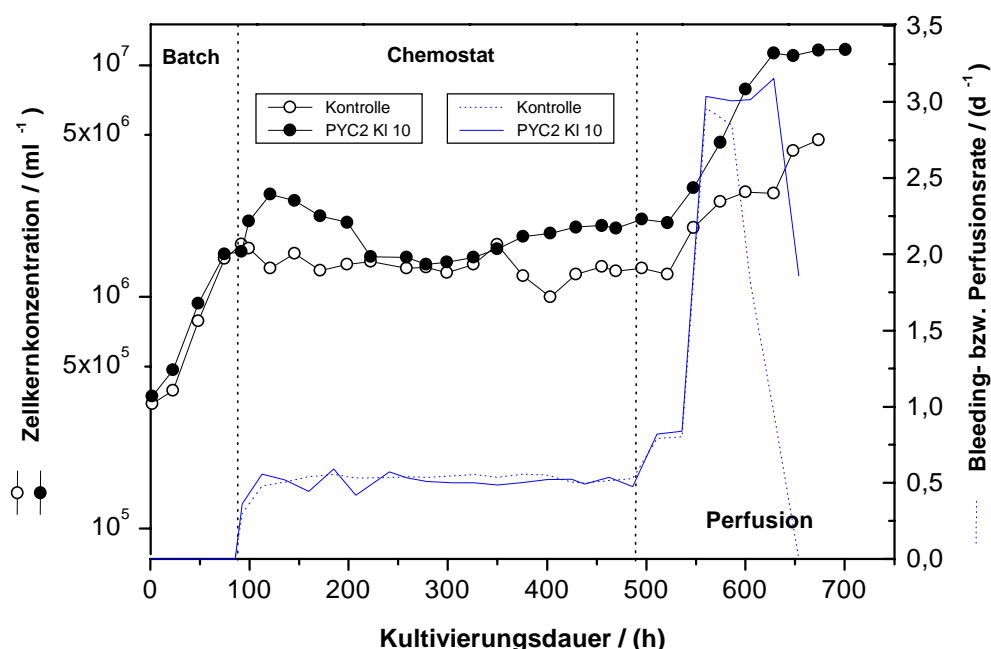
Zur Untersuchung der stoffwechselspezifischen Eigenschaften der PYC2 exprimierenden Zellen wurden weitere Experimente in kontinuierlich geführten Bioreaktoren ausgeführt. Ein Kultivierungsmodus, das sich hierfür besonders eignet, ist der Chemostat. Unter kontinuierlicher Zufuhr von Frischmedium wird dem Reaktor bei gleicher Flußrate Zellsuspension entnommen. Dabei stellt sich ein Zustand des

Fließgleichgewichts oder des “steady state” ein mit stationären Zell- und Substratkonzentrationen. Auf diese Weise werden die Substratverbrauchsrate einerseits unabhängig von der Wachstumsphase, weil sie sich in einem Zustand ständigem exponentiellen Wachstums befinden, und andererseits von den Substratkonzentrationen im Medium. Ein weiterer Kultivierungsmodus ist der Perfusionsbetrieb. Dabei wird dem Reaktor unter Zurückhaltung der Zellen ständig frisches Medium zugeführt und verbrauchtes Medium wieder abgeführt

Die Zellen wurden über längere Zeit im Fließgleichgewicht des Chemostaten kultiviert und die metabolischen Eigenschaften wie Wachstum, Substratverbrauchsrate, Nebenproduktbildungsrate, Sauerstoffverbrauchsrate sowie Nukleotidpools unter diesen konstanten Bedingungen untersucht. Es wurden zwei Fermenter parallel beimpft und kultiviert. Die Kontrollkultur bestand aus einer Mischung von Geneticin-resistenten Zellklonen, während die durch die PYC2 genetisch und metabolisch veränderten Zellen durch den BHK-21 PYC2 Klon 10 repräsentiert wurden. Die Kulturen wurden zunächst im Batchmodus bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert und anschließend auf Chemostatbetrieb umgestellt (s. Abb. 3.2.4.1). Nach 465 h wurde der Reaktor mit Frischmedium perfundiert. Dabei wurde die Perfusionsrate schrittweise von  $0,5 \text{ d}^{-1}$  auf  $3 \text{ d}^{-1}$  erhöht.

#### **3.2.4.1 Wachstum in kontinuierlicher Kultur**

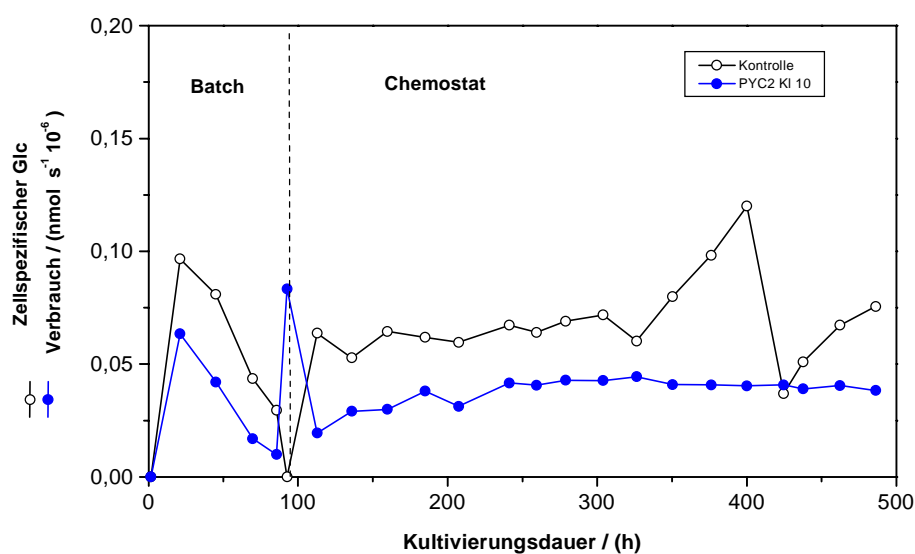
Die BHK-21 PYC2 Klon 10 Kultur sowie die Kontrollkultur erreichten bei ähnlichen Wachstumsraten von  $0,6 \text{ d}^{-1}$  in der Batchphase der Kultivierung eine Zellkonzentration von ungefähr  $1,6 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ . Im Gleichgewichtszustand des Chemostaten stellte sich eine Zellkonzentration von ungefähr  $1,35 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  bei beiden Kulturen ein (s. Abb. 3.2.4.1). Unter Perfusionsbedingungen jedoch vermehrte sich die PYC2 exprimierende Kultur mit einer Wachstumsrate von  $0,43 \text{ d}^{-1}$  und erreichte nach 628 h eine Endzellkonzentration von  $1,16 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ . Die Kontrollkultur erreichte mit einer mittleren Wachstumsrate von  $0,27 \text{ d}^{-1}$  lediglich eine Zellkonzentration von  $4,76 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ . Unter Perfusionsbedingungen konnte in der PYC2 exprimierenden Kultur eine 2,4 fache Zellkonzentration der Kontrolle erreicht werden.



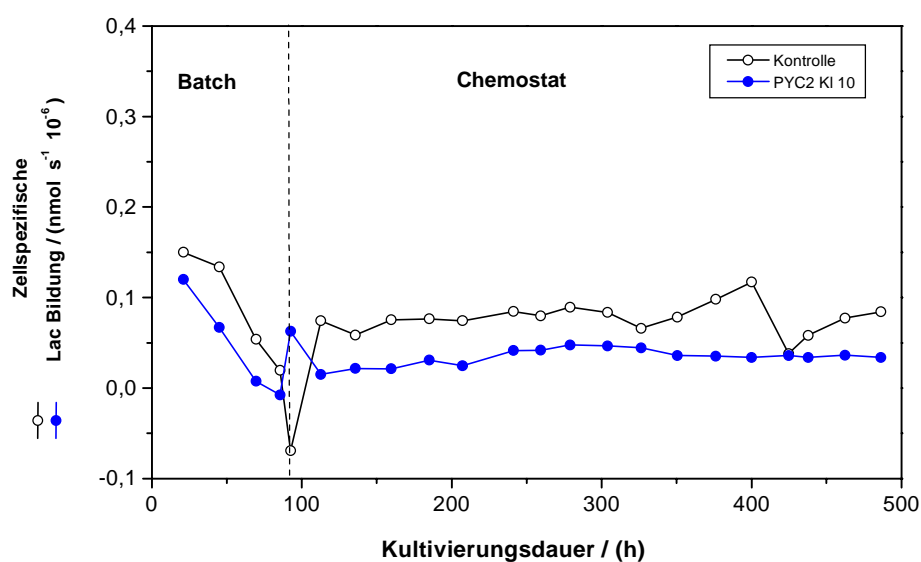
**Abb. 3.2.4.1** Verlauf des Zellwachstums in einem kontinuierlich betriebenen Bioreaktor. Die Reaktoren wurden zunächst im Batchmodus betrieben und anschließend auf Chemostatbetrieb umgestellt. Nach 465 h wurden beide Reaktoren mit Frischmedium perfundiert.

### 3.2.4.2 Substratverbrauchsrate und Endproduktbildungsrate im Chemostaten

Die zellspezifischen Verbrauchsrate wurden für die Phase des Fließgleichgewichts bestimmt. Dazu wurden die Verbrauchswerte von 10 Versuchstagen gemittelt. Das zellspez. Volumen sowie der zellspez. Proteingehalt der Zellen, der zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung gemessen wurde, war für beide Kulturen gleich mit 4,02 pl bzw. 0,25 ng. Der zellspez. Glucoseverbrauch für die Kontrolle lag bei 0,062 nmol s<sup>-1</sup> 10<sup>-6</sup>. Die BHK-21 PYC2 Kultur dagegen hatte mit 0,036 nmol s<sup>-1</sup> 10<sup>-6</sup> etwa die Hälfte des Bedarfs an Glucose (s. Abb. 3.2.4.2a). Die zellspez. Lactatbildungsrate konnten in der PYC2 exprimierenden Kultur auf weniger als die Hälfte reduziert werden.

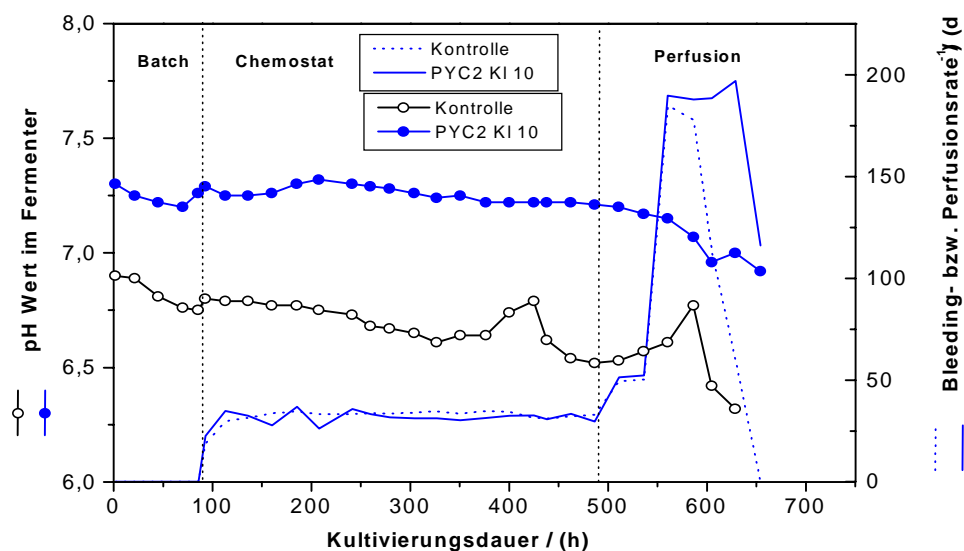


**Abb. 3.2.4.2a** Verlauf der zellspezifischen Glucoseverbrauchsrate im Batch und Chemostaten. Die mittlere zellspez. Glucoseverbrauchsrate der Kontrolle ist im Fließgleichgewicht des Chemostaten etwa doppelt so hoch wie die der BHK-21 PYC2 Klon 10-Kultur. Die mittleren zellspez. Glucoseverbrauchsrate wurden aus 10 Meßwerten innerhalb der Gleichgewichtsphase des Chemostaten ermittelt.

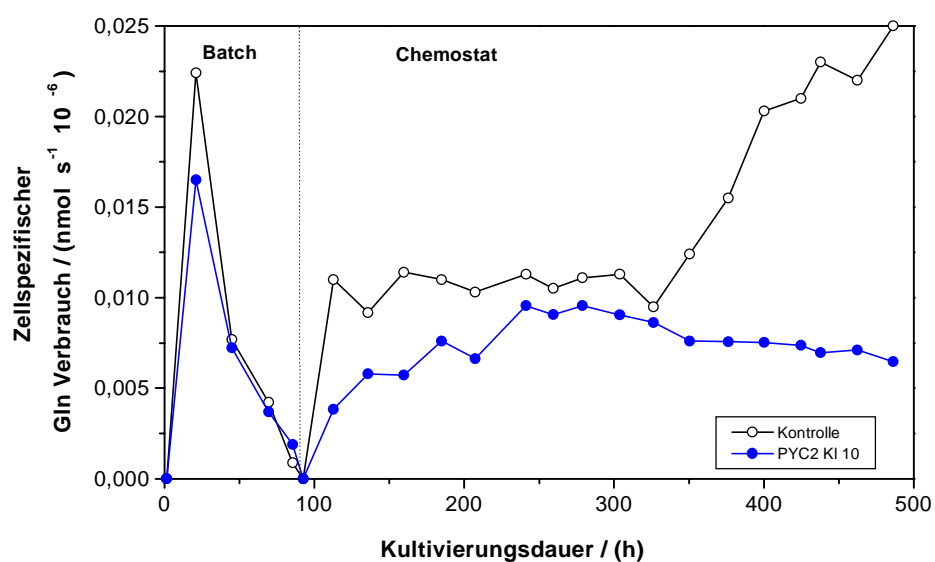


**Abb. 3.2.4.2b** Verlauf der zellspezifischen Lactatbildungsrate im Batch und Chemostatreaktor. Die zellspez. Lactatbildung der PYC2 exprimierenden Kultur war etwa halb so hoch wie die der Kontrollkultur.





**Abb. 3.2.4.2c** pH-Wert und Perfusions- bzw. Bleedingrate im Bioreaktor. Bei gleicher  $\text{CO}_2$  Begasungsrate und gleichem  $\text{pO}_2$  stellen sich unterschiedliche pH-Werte in den Fermentern ein. Die Kontrollkultur ist mit einem mittleren pH-Wert von 6,7 saurer als die PYC2 exprimierende Kultur, die einen pH von 7,3 aufwies.



**Abb. 3.2.4.2d** Verlauf der zellspezifischen Glutaminverbrauchsrate im Batch und Chemostatreaktor.

Die Kontrolle hatte eine mittlere zellspez. Lactatbildungsrate von  $0,076 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  gegenüber  $0,032 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  in der PYC2 exprimierenden Kultur (s. Abb. 3.2.4.2b). Auch das Verhältnis von gebildetem Lactat zur verbrauchten Glucose wurde in der PYC2 exprimierenden Kultur erniedrigt. So lag der Lactat-Glucose Quotient in der Kontrolle bei einem Wert von 1,22, während die PYC2 exprimierende Kultur nur einen Wert von 0,89 hatte. Das ist ein zusätzliches Indiz für eine geringere Rate aerober Glycolyse. Die verbrauchten Glucosebausteine in der PYC2 exprimierenden Kultur werden zu einem geringeren Anteil zu Lactat abgebaut. Der mittlere pH-Wert, der sich in den Kulturen einstellte, lag entsprechend einer höheren zellspez. Lactatbildungsrate in der Kontrolle bei 6,7 und in der PYC2 exprimierenden Kultur bei 7,3. Dabei wurde für eine gleiche  $\text{CO}_2$  Begasungsrate und gleiche Luftsättigung von 40% in der Suspensionskultur gesorgt (s. Abb. 3.2.4.2c).

Mit einer Abnahme der zellspez. Glucoseverbrauchsraten ging ebenfalls eine Abnahme der zellspez. Glutaminverbräuche für die PYC2 exprimierende Kultur einher (s. Abb. 3.2.4.2d). Die zellspez. Glutaminverbrauchsrate der Kontrolle ergab sich zu  $0,01 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  gegenüber  $0,007 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  für die PYC2 exprimierende Kultur. Es zeigt sich, daß der Bedarf an C-Quellen insgesamt abgenommen hat. Es kommt nicht zu einer Kompensation des Gesamtenergiebedarfs durch Substitution einer C-Quelle durch eine andere.

#### **3.2.4.3 Zellspezifische Sauerstoffverbrauchsrate**

Die zellspezifische Sauerstoffverbrauchsrate wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Fermentation gemessen. Während der Gleichgewichtsphase des Chemostaten hatte die PYC2 exprimierende Kultur einen zellspez. Sauerstoffverbrauch von  $102 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ . Die Kontrolle dagegen verbrauchte  $35 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ . Der 2,9 fach erhöhte zellspez. Sauerstoffverbrauch der PYC2 exprimierenden Kultur gegenüber der Kontrolle kann mit einer erhöhten oxidativen Substratphosphorylierung erklärt werden. Der Quotient aus verbrauchtem Sauerstoff zu der Summe der verbrauchten Substrate Glucose und Glutamin gibt den Grad der oxidativen Substratphosphorylierung deutlicher wieder: die Kontrolle hatte ein Verhältnis von 0,48, während es bei der PYC2 exprimierenden Kultur 2,36 waren (s. Tab. 3.1, S. 88).

Die folgende Rechnung ist eine Gegenüberstellung der abgeschätzten Energiebildungsraten, die einerseits mit Hilfe der Differenz der Sauerstoffverbrauchsrate zwischen PYC2 exprimierenden Zellen und Kontrollzellen berechnet wurde, und die andererseits aus der Differenz der Glucose- und Glutaminverbrauchsrate der beiden Kulturen unter Berücksichtigung der glycolytisch und glutaminolytisch freigesetzten Energiebeträge zustande gekommen ist.

Nach Miller et al. (1987) sowie Ozturk und Palsson (1990) ist die ATP Produktionsrate direkt proportional zu der Sauerstoffverbrauchsrate und läßt sich vereinfacht wie folgt darstellen:

$$q_{\text{ATP}} = q_{\text{Lac}} + 2 \cdot \left( \frac{P}{O} \right) \cdot q_{\text{O}_2}$$

$q_{\text{ATP}}$  = ATP Produktionsrate

$q_{\text{Lac}}$  = Lactatbildungsrate

$q_{\text{O}_2}$  =  $\text{O}_2$  Verbrauchsrate

$\left( \frac{P}{O} \right)$  = Gebildete Mole ATP pro verbrauchte Mole atomaren Sauerstoffs  
(P/O = 2 oder 3; Hinkle und Yu, 1979)

Unter Zuhilfenahme der obigen Gleichung kann die ATP Produktionsrate auf Basis der Sauerstoffverbrauchsrate berechnet werden:

Es wurde angenommen, daß das P/O Verhältnis 2 beträgt. Die Differenz der Sauerstoffverbrauchsrate für BHK-21 PYC2 Klon 10 und die Kontrolle betrug  $67 \text{ pmol s}^{-1} \cdot 10^{-6}$ . Die ATP Bildungsrate, die allein durch den Einfluß der oxidativen Phosphorylierung zustande kommt, beträgt somit  $268 \text{ pmol s}^{-1} \cdot 10^{-6}$ .

Die BHK-21 PYC2 Klon 10 Kultur hat einen niedrigeren Glucose- und Glutaminverbrauch als die Kontrolle. Es kann die ATP Bildungsrate berechnet werden, die aufgrund eines glycolytischen und glutaminolytischen Abbaus der Differenz der Glucose- und Glutaminverbrauchsrate der genannten Kulturen zustande kommen würde. Ein Vergleich dieses Betrages mit der oxidativ erzeugten ATP Bildungsrate kann zeigen, ob die geringere glycolytische Nutzung von Glucose und Glutamin durch eine höhere oxidative Verbrennung von Glucose kompensiert werden kann. Die Differenz der Glucoseverbrauchsrate betrug  $26 \text{ pmol s}^{-1} \cdot 10^{-6}$ . Die sich daraus

ergebende ATP Bildungsrate beläuft sich auf  $42 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ , wenn von einer ATP Bildung von 2 Mol pro Mol Glucose ausgegangen wird (Stryer, 1990). Die Differenz des Glutaminverbrauchs bringt eine ATP Bildungsrate zwischen  $28$  und  $84 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ , je nach dem Grad der oxidativen Abbaurate des Glutamins (vgl. Tab. 1.1.2). Die Summe der ATP Bildungsraten aus Glucose und Glutamin bewegt sich somit zwischen  $70$  und  $126 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ .

Die oxidative ATP Bildungsrate ist mit  $268 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$  mehr als doppelt so hoch wie die Energieerzeugung, die durch den glycolytischen Abbau von Glucose bereitgestellt werden könnte.

#### **3.2.4.4 Nukleotidpools**

##### **Zellspezifischer ATP und GTP Gehalt**

Der ATP und GTP Gehalt pro Zelle wurde für den Verlauf der gesamten Fermentation aufgenommen. Innerhalb der Gleichgewichtsphase des Chemostaten stellte sich ein mittlerer zellspez. ATP Gehalt von  $4,14 \pm 0,52 \text{ fmol}$  pro Zelle für die Kontrollkultur ein. Die BHK-21 PYC2 Zellen hatten einen mittleren zellspez. ATP Gehalt von  $5,72 \pm 0,53 \text{ fmol}$ . Der mittlere zellspez. GTP Gehalt betrug für die PYC2 exprimierenden Kultur  $0,98 \pm 0,003 \text{ fmol}$  und  $0,74 \pm 0,003 \text{ fmol}$  für die Kontrollkultur. Da das Zellvolumen beider Vergleichskulturen nahezu identisch war, kam es zu einer leichten Erhöhung des zellspez. ATP und GTP Gehaltes in der BHK-21 PYC2 Kultur (s. Abb. 3.2.4.4a und b).

##### **Zellspezifischer UDPGNac Gehalt**

Der zellspezifische UDPGNac Gehalt der Kontrollzellen war mit  $2,64 \pm 0,016 \text{ fmol}$  gegenüber der Kontrolle mit lediglich  $1,48 \pm 0,011 \text{ fmol}$  deutlich erhöht (s. Abb. 3.2.4.4c). Dabei konnte mit Hilfe einer ammoniumsensitiven Elektrode für beide Kulturen in der Gleichgewichtsphase des Chemostaten, zwischen den Kultivierungsstunden 135 und 376, eine nahezu identische mittlere Ammoniumkonzentration von  $0,44 \text{ mmol l}^{-1}$  im Kulturmedium ermittelt werden.

### Theoretische Abschätzung der Ammoniumkonzentration im Kulturmedium

Da die Messung der Ammoniumkonzentration mit der Ammoniumelektrode als nicht verlässlich und exakt genug erachtet wurde, erfolgte eine theoretische Abschätzung der sich im Gleichgewicht des Chemostaten einstellenden Ammoniumkonzentration mit Hilfe der von Tritsch und Moore (1962) experimentell ermittelten Zerfallskinetik von Glutamin. Diese Autoren bestimmten einen täglichen Zerfall von 10 % Glutamin bei 37°C und einen pH-Wert von 7,2. Die gesamte Ammoniumbildung im Medium setzt sich nach Ozturk und Palsson (1990) einerseits aus dem Glutaminverbrauch der Zellen und andererseits aus dem thermischen Zerfall von Glutamin wie folgt zusammen:

$$\frac{d[\text{NH}_4^+]}{dt} = k[\text{Gln}] + P_{\text{NH}_4^+} \cdot X$$

$[\text{NH}_4^+]$ : Ammoniumkonzentration ( $\text{mmol l}^{-1}$ )

$P_{\text{NH}_4^+}$ : zellspez. Ammoniumfreisetzung ( $\text{mmol s}^{-1}$ )

$[\text{Gln}]$ : Glutaminkonzentration ( $\text{mmol l}^{-1}$ )

$k$ : thermische Zerfallkonstante ( $\text{s}^{-1}$ )

$t$ : Zeit (s)

$X$ : Zellkonzentration ( $\text{ml}^{-1}$ )

Die metabolisch verbrauchte Menge Glutamin kann durch die Differenz der Glutaminkonzentrationen im Medium zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt werden:

$$P_{\text{NH}_4^+} \cdot X = C_{\text{Gln}, t-1} - C_{\text{Gln}, t}$$

$C_{\text{Gln}, t-1}$ : Glutaminkonzentration  
zum Zeitpunkt  $t-1$  ( $\text{mmol l}^{-1}$ )

Für die Ammoniumfreisetzung aus der Glutaminolyse wurde ein Wert von 1,5 als Mittelwert zwischen 1 und 2 Molen Ammonium pro Mol verbrauchtem Glutamin eingesetzt. Der Zerfall von Glutamin wurde mit 10 % pro Tag angenommen. Die Ammoniumkonzentration zum Zeitpunkt  $t$  berechnet sich wie folgt:

$$C_{\text{NH}_4^+}^+, t = \sum_{t=1}^n C_{\text{NH}_4^+}^+, t-1 + C_{\text{Gln}} \cdot t \cdot 0,1 \text{d}^{-1} + q_{\text{Gln}} \cdot X \cdot \Delta t \cdot 1,5$$

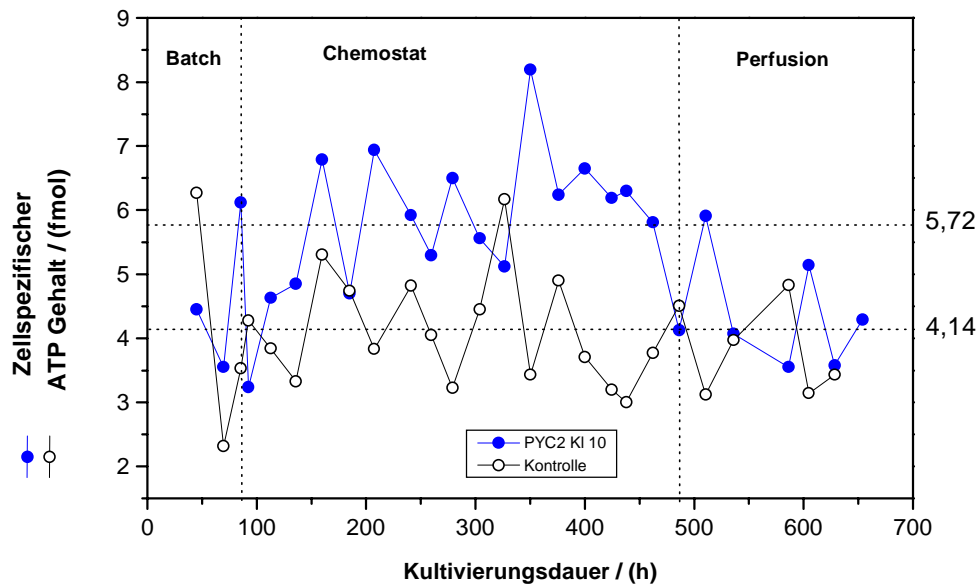
Im Fließgleichgewicht des Chemostaten gilt:

$$C_{\text{NH}_4^+}^+, \text{stat}, t = C_{\text{NH}_4^+}^+, t-1 + C_{\text{NH}_4^+}^+, \text{ein} - C_{\text{NH}_4^+}^+, \text{aus} + C_{\text{NH}_4^+}^+, \text{Zerfall} + C_{\text{NH}_4^+}^+, \text{Met}$$

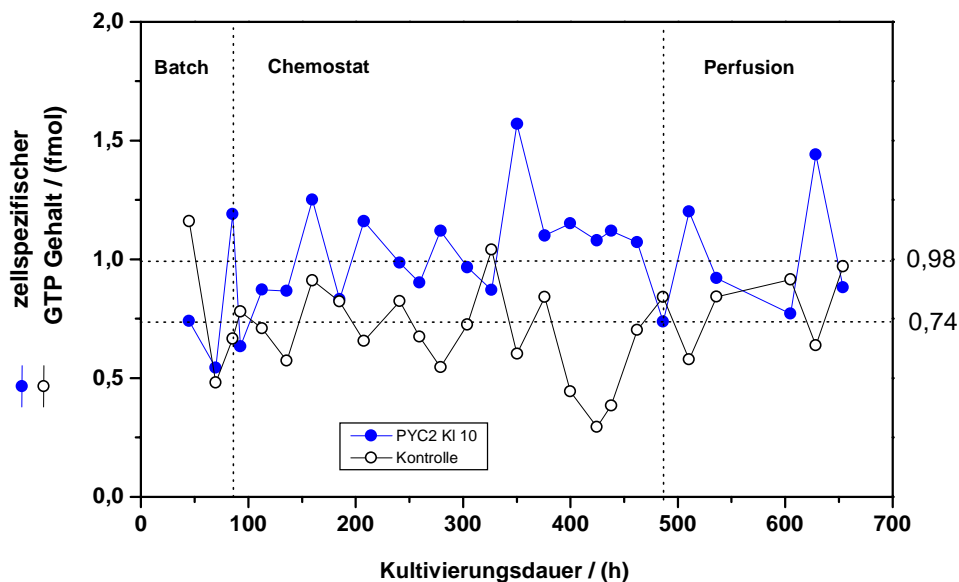
$$C_{\text{NH}_4^+}^+, t = C_{\text{NH}_4^+}^+, t-1 + D_t \cdot \Delta t \cdot (C_{\text{NH}_4^+}^+, 0 - C_{\text{NH}_4^+}^+, t-1) + C_{\text{Gln}} \cdot 0,1 \text{d}^{-1} \cdot \Delta t + q_{\text{Gln}} \cdot X \cdot \Delta t \cdot 1,5$$

$C_{\text{NH}_4^+}^+, t$ :	Ammoniumkonzentration zum Zeitpunkt t (mmol l <sup>-1</sup> )	X:	mittlere Zellkonzentration zum Zeitpunkt t (ml <sup>-1</sup> )
$\Delta t$ :	Zeit zwischen zwei Messungen (s)	$C_{\text{NH}_4^+}^+, \text{stat}, t$ :	stationäre Ammoniumkonzentration zum Zeitpunkt t (mmol l <sup>-1</sup> ) = $C_{\text{NH}_4^+}^+, t$
$q_{\text{Gln}}$ :	zellspez. Glutamin verbrauchsrate- (nmol s <sup>-1</sup> 10 <sup>-6</sup> )	$C_{\text{NH}_4^+}^+, t-1$ :	stationäre Ammoniumkonzentration zum Zeitpunkt t-1 (mmol l <sup>-1</sup> )
$C_{\text{NH}_4^+}^+, \text{zerfall}$ :	Ammoniumkonzentration aus dem Zerfall von Glutamin (mmol l <sup>-1</sup> )	$C_{\text{NH}_4^+}^+, \text{aus}$ :	Ammoniumkonzentration des Bleeds (mmol l <sup>-1</sup> ) = $C_{\text{NH}_4^+}^+, t-1$
$C_{\text{NH}_4^+}^+, \text{Met}$ :	Ammoniumkonzentration aus der Metabolisierung von Glutamin (mmol l <sup>-1</sup> )	$C_{\text{NH}_4^+}^+, \text{ein}$ :	Ammoniumkonzentration des Mediums (mmol l <sup>-1</sup> ) = $C_{\text{NH}_4^+}^+, 0$
$D_t$ :	Bleedingrate (d <sup>-1</sup> )		
$C_{\text{Gln}}$ :	mittlere Gln Konzentration zwischen zwei Zeitpunkten (mmol l <sup>-1</sup> )		

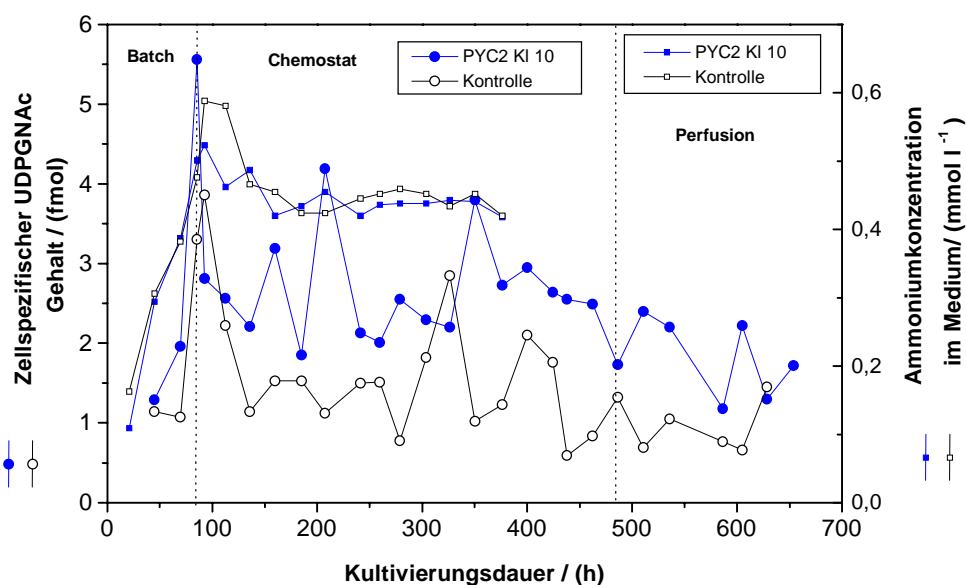
Abbildung 3.2.4.4.c stellt die experimentell ermittelten und Abbildung 3.2.4.4.d die berechneten Ammoniumkonzentrationen über die Zeit dar. Die berechneten Werte entsprachen ungefähr der Hälfte der experimentell ermittelten Werte. Die berechnete Ammoniumfreisetzung in der PYC2 exprimierenden Kultur war während der Batchphase deutlich höher als in der Kontrollkultur. Während der Gleichgewichtsphase des Chemostaten näherten sich die Konzentrationen in beiden Kulturen an, die PYC2 exprimierende Kultur wies jedoch zeitweise höhere Ammoniumwerte auf. In diesem Zusammenhang sollte in Betracht gezogen werden, daß der Zerfall von Glutamin in starkem Maße von der Temperatur (Tritsch und Moore, 1962), der Medienzusammensetzung und dem pH-Wert des Mediums (Ozturk und Palsson, 1990) sowie der Ionenstärke (Gilbert et al., 1949) und Serumkonzentration (Lin und Agrawal, 1988) abhängt. Da die verwendete Konstante von Tritsch und Moore unter anderen



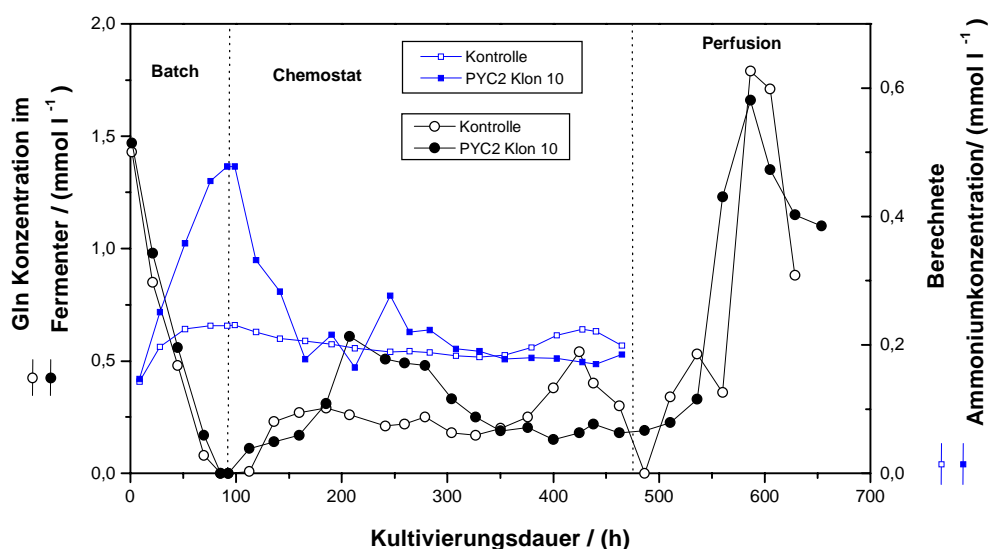
**Abb.3.2.4.4a** Zellspezifischer ATP Gehalt einer BHK-21 PYC2 Klon 10 Kultur und einer Kontrollkultur. Die ATP Gehalte wurden für 10 Messungen innerhalb der Gleichgewichtsphase des Bioreaktors gemittelt. Die Unterschiede zwischen den Kulturen ist in dieser Phase besonders ersichtlich. Die Batch- und Perfusionsphase zeigen keine eindeutigen Unterschiede in den Nukleotidgehalten.



**Abb. 3.2.4.4b** Zellspezifischer GTP Gehalt einer BHK-21 PYC2 Klon 10 Kultur und einer Kontrollkultur. Die GTP Gehalte wurden ebenfalls für 10 Messungen innerhalb der Gleichgewichtsphase des Bioreaktors gemittelt. Ähnlich wie die ATP Gehalte ist der zelluläre GTP Gehalt der PYC2 Zellen gegenüber der Kontrolle erhöht.



**Abb. 3.2.4.4c** Verlauf des zellspezifischen UDPGNAC Gehaltes der Zellen sowie der Ammoniumkonzentrationen im Kulturmedium. Der UDPGNAC Gehalt in den mit PYC2 transfizierten Zellen war gegenüber der Kontrolle erhöht. Die mittlere Ammoniumkonzentration im Medium, ermittelt mit der Ammoniumelektrode, war bei beiden Kulturen mit  $0,44 \text{ mmol l}^{-1}$  nahezu identisch.



**Abb. 3.2.4.4.d** Darstellung der Glutaminkonzentrationen im Medium sowie der berechneten Ammoniumkonzentrationen im Medium. Die Berechnung der Ammoniumkonzentration erfolgte mit Hilfe der von Tritsch und Moore (1962) ermittelten Zerfallskonstante für die Konversion von Glutamin zu Pyrrolidon-Carboxylsäure.

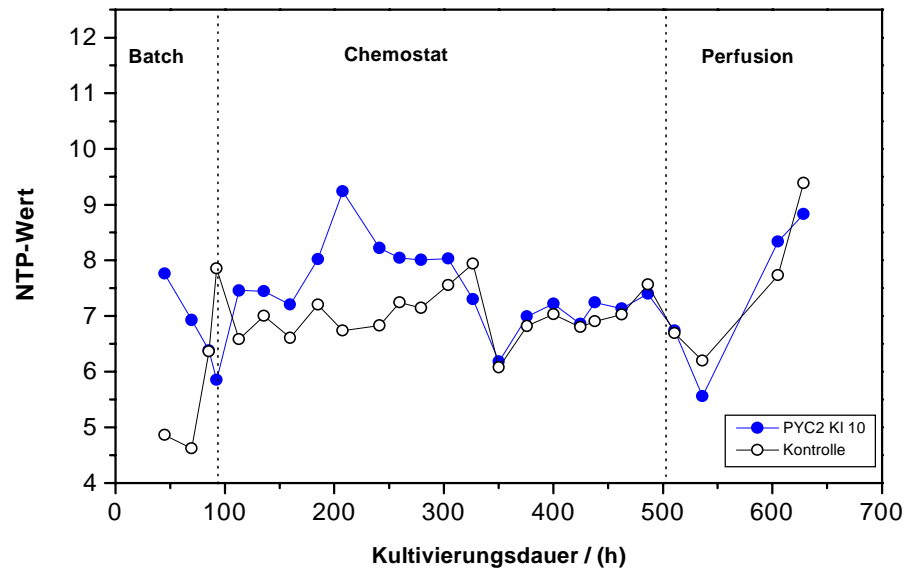


Bedingungen nämlich in einem Eagle's Medium bei einem pH-Wert von 7,2 ermittelt wurde, kann es durchaus zu Abweichungen der experimentellen und berechneten absoluten Werte kommen. Es kann jedoch durchaus ein relativer Vergleich der Ammoniumkonzentrationen zwischen den beiden Kulturen vorgenommen werden, da die Parameter Medienzusammensetzung, Temperatur, Ionenstärke und Serumkonzentration für beide Kulturen einheitlich gehalten wurde. Die Größe, die in beiden Kulturen nicht einheitlich gehalten wurde war der pH-Wert. Da der pH-wert in der PYC2 exprimierenden Kultur höher lag als in der Kontrollkultur, würde es in dieser Kultur zu einem gesteigertem Glutaminzerfall kommen. Das würde die berechneten Werte unterstützen.

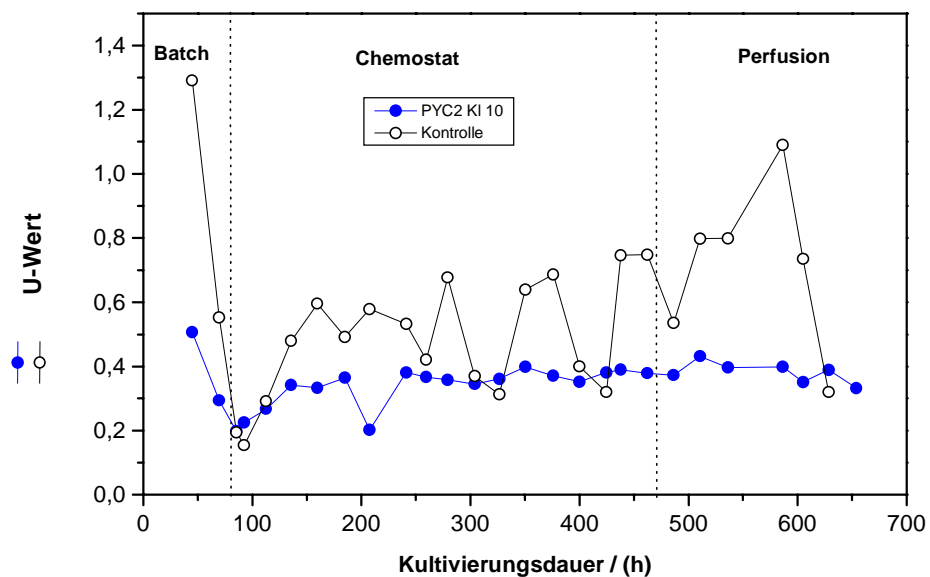
#### **Der NTP-, U- und NTP/U-Wert**

Der Verlauf des NTP-Wertes, der Quotient aus der Summe der Purin- und Pyrimidintriphosphate, verhielt sich bei den zwei Kulturen in der Batchphase gegenläufig. Die Kontrollkultur verzeichnete einen Anstieg des NTP-Wertes von 4,86 auf 7,85 gegen Ende der Batchphase. Die PYC2 exprimierende Kultur fing bei einem relativ hohen NTP-Wert von 7,76 an und fiel auf 5,85 ab. Von Anfang bis zur Mitte der Chemostatphase nahm der NTP-Wert in der PYC2 exprimierenden Kultur wieder zu und lag mit 7,89 im Mittel höher als die Kontrollkultur mit 7,08. Gegen Ende der Kultivierung glichen sich die NTP-Werte in beiden Kulturen an (s. Abb. 3.2.4.4e). Der U-Wert fiel in beiden Kulturen während der Batchphase ab. Anschließend stieg der U-Wert der Kontrollkultur wieder an und war für die gesamte Kultivierungsdauer höher als die der Kontrolle (s. Abb. 3.2.4.4f).

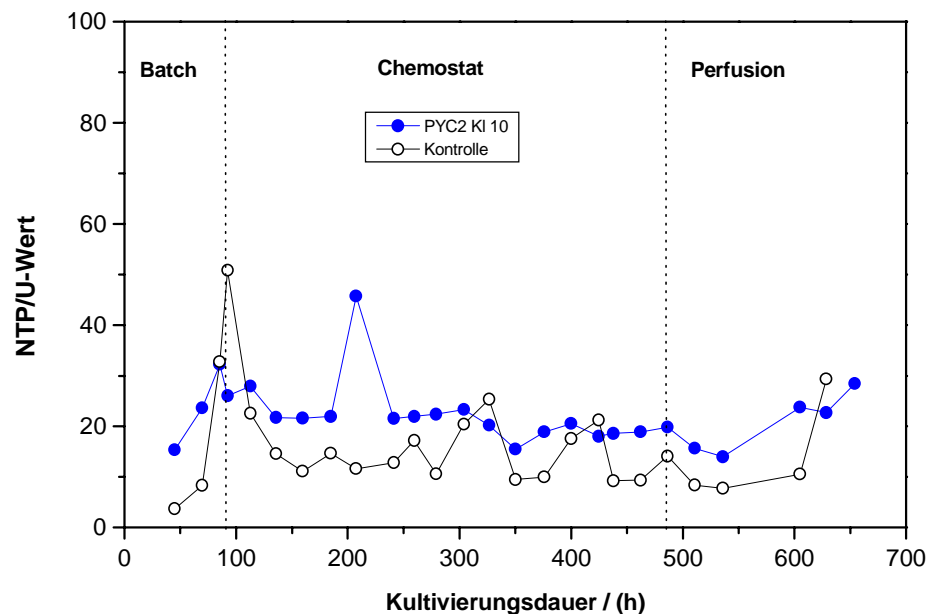
Der NTP/U-Wert (s. Abb. 3.2.4.4g) für die PYC2 exprimierende Kultur lag während des Chemostat- sowie des Perfusionsmodus höher als die der Kontrolle. Diese Beobachtung ist auf einen erhöhten NTP- sowie einen kleineren U-Wert zurückzuführen.



**Abb. 3.2.4.4e** Der Verlauf der NTP-Werte für die PYC2 exprimierende Kultur und Kontrollkultur. Während der Batchphase sind die Verläufe gegenläufig. Im Chemostaten weist die PYC2 exprimierende Kultur einen erhöhten NTP-Wert auf.



**Abb. 3.2.4.4f** Der Verlauf des U-Wertes in beiden Kulturen. Die Kontrolle hatte fast zu allen Zeiten der Kultivierung einen höheren U-Wert als die PYC2 exprimierende Kultur. Der U-Wert der PYC2 exprimierenden Kultur hielt sich relativ konstant bei einem Wert von 0,35. Die Kontrollkultur hatte bei größeren Schwankungen einen mittleren U-Wert von 0,55.

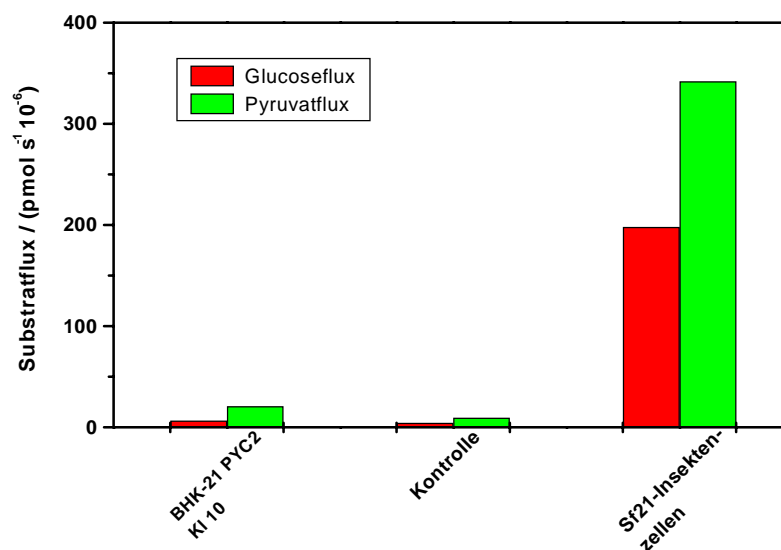


**Abb. 3.2.4.4g** Verlauf des NTP/U-Wertes im Chemostaten. Der NTP/U-Wert war in der PYC2 exprimierenden Kultur gegenüber der Kontrollkultur erhöht.

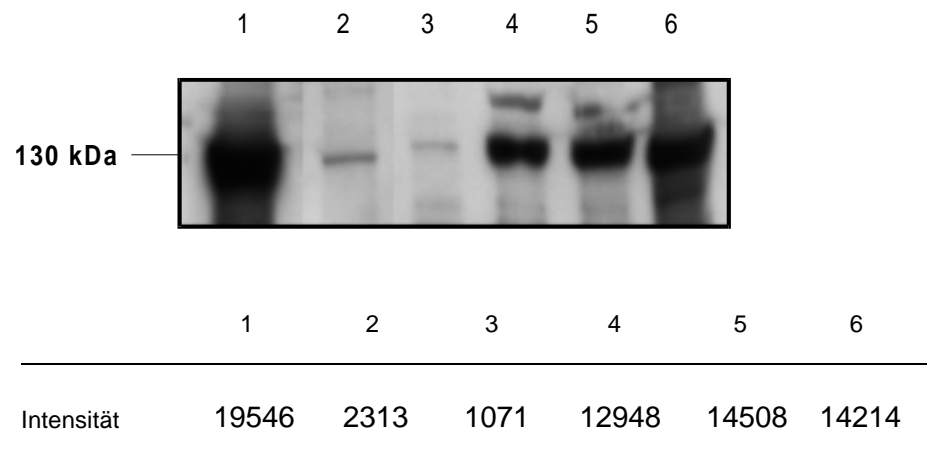
### 3.2.5 Der degenerierte Metabolismus der kontinuierlichen Zelllinien - Vergleich zwischen kontinuierlichen Zelllinien, Insekten- und Primärzellen

Für die Demonstration einiger Unterschiede zwischen veränderten, kontinuierlichen Zellen und Zellen mit normalem Primärmetabolismus, wurde zum einen der Flux von Substraten in den Citratcyclus und zum anderen die Expressionsrate der Pyruvat-Carboxylase herangezogen. Der Unterschied der Pyruvat-Carboxylase-Expression in den verschiedenen Zellen soll die Notwendigkeit für die Einführung von PYC2 in kontinuierlichen Zelllinien aufzeigen. Sf21-Insektenzellen zeichnen sich durch eine geringe Produktion von Lactat als Endprodukt des Glucosestoffwechsels aus. Außerdem haben sie, im Gegensatz zu tierischen Zellen, einen hohen Sauerstoffbedarf. Beides spricht für einen hohen Grad an oxidativem Abbau von Glucose. Der Flux von radioaktiver Glucose in den Citratcyclus betrug bei Sf21-Zellen

198  $\text{pmol min}^{-1} 10^{-6}$ , und der Pyruvatflux lag bei 342  $\text{pmol min}^{-1} 10^{-6}$ . Die BHK-21A-Zellen hingegen hatten jeweils einen Flux von 4,5  $\text{pmol min}^{-1} 10^{-6}$  für D-[6- $^{14}\text{C}$ ]-Glucose und 9,57 für [1- $^{14}\text{C}$ ]-Pyruvat (s. Abb. 3.2.5a). Die Fluxraten der Sf21-Zellen waren um ein 30 bis 40 faches höher als die der BHK-Zellen. Die ineffiziente Nutzung von Glucose erklärt den hohen Bedarf desselben in kontinuierlichen Zellen. Der Western Blot in Abbildung 3.2.5b zeigt einen Vergleich der Expressionsraten der Pyruvat-Carboxylase für BHK-21 Zellen, frische, primäre Nieren- und Leberzellen sowie Sf21-Insektenzellen. Ähnlich wie die Substratfluxraten lag die Expressionsrate der Pyruvat-Carboxylase in den Primärzellen sowie den Sf21-Insektenzellen, wie aus der densitometrischen Messung der Bandenintensitäten zu entnehmen ist, um einen Faktor von 10 höher als in den BHK-21 Zellen.

**Abb. 3.2.5a**

Vergleichende Darstellung des Fluxes radioaktiver Glucose und von radioaktivem Pyruvat in Insektenzellen sowie BHK-21A Zellen mit (BHK-21 PYC KI 10) und ohne (Kontrolle) PYC2-Expression. Die Substratfluxe für die Insektenzellen sind um ein 30 bis 40 faches höher als in den Kontroll BHK-21A Zellen.



**Abb. 3.2.5b** Immunoblots für den Nachweis von Pyruvat-Carboxylase in BHK-21A Zellen mit und ohne PYC2-Expression, Insektenzellen und verschiedene Primärzellen. **1:** Rinder-PC Standard mit der 130 kDa Untereinheit, **2:** BHK-21 PYC2 Klon 10, **3:** BHK-21 A Kontrollzellen (2 und 3 jeweils 8,5 µg Protein bzw.  $5 \times 10^4$  Zellen/Geltasche), **4:** Maus Leberzellen (17 µg Protein/Geltasche), **5:** Maus Nierenzellen (13,7 µg Protein/Geltasche), **6:** Sf21-Insektenzellen (8,5 µg Protein/Geltasche). Die Primär- und Insektenzellen exprimieren deutlich mehr Pyruvat-Carboxylase als die kontinuierlichen BHK-21 A Zellen, obwohl teilweise die doppelte Proteinmenge aufgetragen wurde. In der zugehörigen Tabelle sind jeweils die densitometrisch gemessenen Intensitäten der Banden dargestellt.

---

**Zusammenfassung von 3.1 und 3.2:**

1. Die erfolgreiche Transfektion und Expression der Pyruvat-Carboxylase konnte durch Northern und Western Blot Analyse sowie Enzymaktivitätstests gezeigt werden.
2. Die Expression der PYC2 hatte keinen Einfluß auf das Wachstum. Es wurden gleiche Wachstumsraten sowie maximale Zellkonzentrationen in Satzkultur (Batch) erhalten.
3. Die PYC2 exprimierenden Zellen zeichneten sich durch folgende metabolische Eigenschaften gegenüber der Kontrolle aus:
  - Eine längere Erhaltung der Zellvitalität in Batchkulturen
  - Geringere Glucose- und Glutaminverbrauchsrate sowie Lactatbildungsrate sowohl im Batch als auch in kontinuierlichen Kultivierungen
  - Geringeres Lac/Glc Verhältnis
  - Ein erhöhter Flux von Glucose und dem Glycolysemetabolit Pyruvat in den Citratcyclus
  - Erhöhte Sauerstoffverbrauchsrate in kontinuierlicher Kultur
  - Leichte Erhöhung des zellulären ATP Gehaltes in kontinuierlichen Kulturen
  - Erhöhte zelluläre UDPGNAc Gehalte
  - Erhöhte NTP-Werte in kontinuierlicher Kultur

**Tab. 3.1** Vergleichende Zusammenfassung einiger metabolischer Daten für satzweise (Batch) und kontinuierlich kultivierte BHK-21 PYC2 Kulturen und Kontrollzellen.

zellspezifische metabolische Daten	Batchkultur		kontinuierliche Kultur		Verbesserungsfaktor [-]	
	Kontrolle	Klone	Kontrolle	Klone	Batch	Chemostat
zellspez. Glc Verbrauchsrate [ $\mu\text{mol s}^{-1} 10^{-6}$ ]	205	51 - 140	62	36	1.4 - 4.0	1.8
zellspez. Gln Verbrauchsrate [ $\mu\text{mol s}^{-1} 10^{-6}$ ]	48	27.0 - 44.0	10.3	7.2	1.1 - 1.8	1.4
zellspez. Lac Bildungsrate [ $\mu\text{mol s}^{-1} 10^{-6}$ ]	332	130 - 210	76	32	1.6 - 2.6	2.3
zellulärer ATP Gehalt [fmol]	n.d.	n.d.	4.14	5.72	-	1.4
O <sub>2</sub> Verbrauchsrate [ $\mu\text{mol s}^{-1} 10^{-6}$ ]	n.d.	n.d.	35	102	-	2.9
Lac/Glc Verhältnis	1.66	1.37 - 1.50	1.22	0.89	1.2	1.4
O <sub>2</sub> / (Glc + Gln)	n.d.	n.d.	0.48	2.36	-	4.9

### **3.3 Untersuchung der Produktion rekombinanter Proteine von PYC2 exprimierenden Zelllinien**

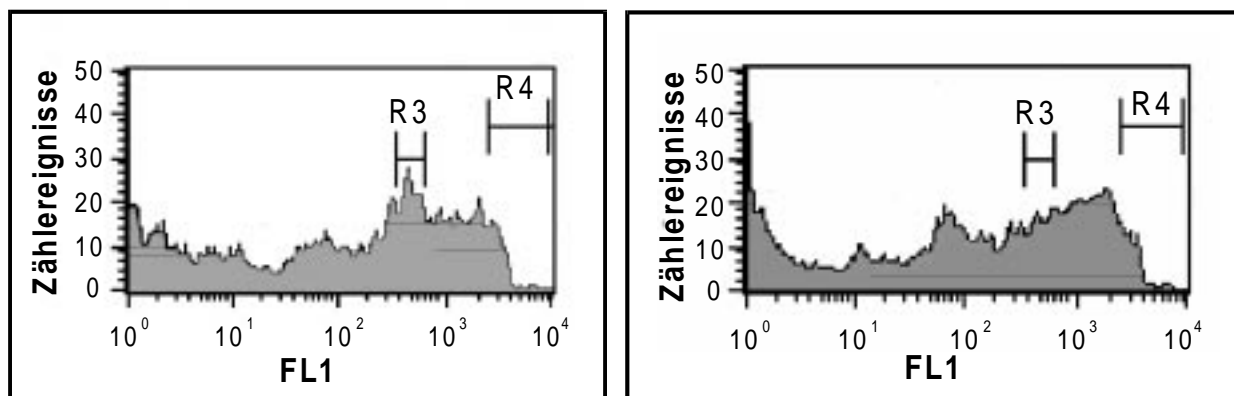
Zur Untersuchung des Einflusses der Hefe-Pyruvat-Carboxylase auf die Produktivität wurde das humane Erythropoetin (rhuEPO) als Modellprotein ausgewählt, da es sich hierbei um ein komplex glycosyliertes und sekretiertes Protein handelt. Außerdem geht rhuEPO keine metabolischen Wechselwirkungen mit der Pyruvat-Carboxylase ein. Zur schnellen und einfachen Kontrolle der Expression sowie für Zwecke der Zellsortierung wurde das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP, Zhang et al., 1996) als Reporterprotein zusätzlich zum rhuEPO in die Zellen eingeführt. Für die PYC2 exprimierenden Zellen wurde der bereits zuvor verwendete repräsentative Klon 10 zur erneuten Transfektion eingesetzt. Die Kontrolle stellte die gleiche Mischung von Geneticin-resistenten Zellklonen dar, die in den vorangegangenen Experimenten verwendet wurde. Beide Zelllinien wurden mit einem Hygromycin-Resistenz-Plasmid, pHMR272, sowie dem bicistronischen pSBC-EGFP-rhuEPO Plasmid (s. Abb. 2.8.2) cotransfiziert.

#### **3.3.1 Selektion und FACS-Sortierung von rhuEPO exprimierenden Zellen**

Nach der Transfektion wurden die Zellen im ZKT-1 Kultivierungsmedium mit dem Zusatz von  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  Hygromycin selektiert. Die Mischung aller erhaltenen Zellklone wurde einer FACS-Analyse unterworfen und anschließend sortiert. Um die Produktivität der Zellen in Abhängigkeit vom veränderten Energiemetabolismus zu untersuchen, war es notwendig, Zellen gleicher rhuEPO-Produktivität miteinander zu vergleichen. Die Auswahl von einzelnen PYC2- und Kontrollzellklonen für den Vergleich der Produktivitäten ist weniger geeignet, da die Produktivität von einzelnen Klonen aufgrund der integrierten Kopienzahl von Fremd-DNA und der jeweiligen Integrationsstelle im Genom starken Schwankungen unterworfen ist (Wirth et al., 1993, Hauser und Wagner, 1997). Die FACS-Sortierung von Zellen anhand der Expression eines Reportergens wurde als Methode für diese Fragestellung gewählt. Die Sortierung von hochexprimierenden Zellen wird bereits routinemäßig durch den Einsatz von



bicistronischen Vektoren mit einem Reporterprotein durchgeführt (Kaufmann et al., 1987, Boel et al., 1987, Balland et al., 1988, Wirth et al., 1991). Für die folgenden Versuche wurde angenommen, daß die Expression des Reporterproteins EGFP im ersten Cistron des bicistronischen Konstruktes mit der des rhuEPO korreliert, das unter der Kontrolle des gleichen Promoters gestellt ist (Wirth et al., 1990). Durch das Sortieren einiger Millionen Zellen, die sich in einem Intervall gleicher Fluoreszenzintensität befanden, konnten Zellklonmischungen gleicher Produktivität erhalten werden. Dabei wurden Zellen mit hoher (R4) und niedriger (R3) Produktivität sortiert (s. Abb. 3.3.1). Für die hochexprimierenden Zellen (R4) war die EGFP-Expression bereits nach zwei Wochen erloschen. Aus diesem Grund wurde mit der stabilen Fraktion R3 weitergearbeitet. Die sortierten Zellen, die sowohl die PYC2 als auch das rhuEPO exprimierten wurden mit PYC2-rhuEPO bezeichnet (s. Abschnitt 2.1.1.1). Die dazugehörige Kontrolle, die lediglich das rhuEPO exprimierte wurde zur Vereinfachung mit Kontrolle-rhuEPO bezeichnet (s. 2.1.1.1).



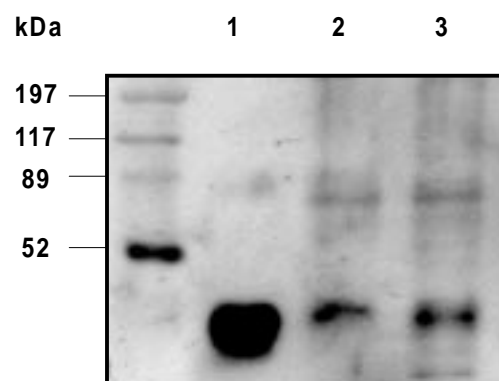
**Abb. 3.3.1** Verteilung der EGFP-Fluoreszenz für Kontroll- (links) und PYC2-Zellen (rechts), die mit dem bicistronischem EGFP-EPO-Plasmid transfiziert wurden. Die Ordinate stellt die Fluoreszenzintensität dar, während die Abszisse die Anzahl der Ereignisse angibt. Zellen in dem Intervall R3 zeigen mäßig gute Expression, während sich im Intervall R4 Zellen sehr guter Expression wiederfinden. Die hochexprimierenden Zellen aus dem Intervall R4 stellten sich jedoch als äußerst instabil heraus.

### 3.3.2 Expressionskontrolle des rhuEPO

Die sortierten Zellmischungen wurden in 6-Loch-Platten kultiviert und auf ihre Produktivität hin untersucht. Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten

genommen und das rhuEPO durch den Zusatz von Ethanol gefällt (s. Abschnitt 2.5.3). Anschließend wurden die getrockneten Proben einer Western Blot Analyse unterzogen (s. Abb. 3.3.2). Die Größe des rekombinanten humanen Standard-rhuEPO, das von einer rekombinanten BHK-21 Zelllinie stammte (Harald Conradt, Abteilung Proteinglycosylierung, GBF), bewegte sich aufgrund der Heterogenität der Glycanstrukturen in dem Bereich von 36 und 30 kDa. Die Molmasse der rhuEPO Proben aus den PYC2- und Kontrollzellen lag mit 36 bis 34 kDa in dem Streubereich des Standard-rhuEPO. Die zusätzliche Bande, die bei etwa 80 kDa auftrat, ist möglicherweise auf rhuEPO Aggregate zurückzuführen, die bei der Verwendung des proteinfreien SMIF7 Mediums auftreten können (Harald Conradt, persönliche Kommunikation).

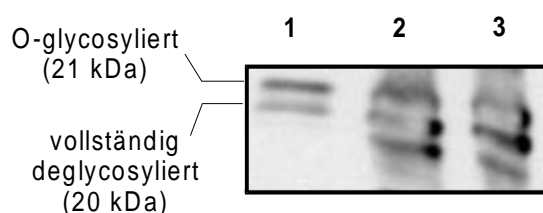
Die Expression des rhuEPO wurde zusätzlich bei allen Versuchen mit Hilfe des EPO-ELISA nachgewiesen und quantifiziert. Die zellspez. Produktivität der sortierten PYC2- sowie Kontrollzellen (R3) wurde in 6-Loch-Platten Kulturen zu ungefähr  $900 \text{ pg h}^{-1} 10^{-6}$  bestimmt.



**Abb. 3.3.2** Expression des rhuEPO in BHK-21 A Zellen, die mit dem bicistronischem EGFP-EPO Vektor transfiziert wurden. Außen links Molmassenstandard, **1:** 72 ng/Geltasche Standard-rhuEPO aus einer rekombinanten BHK-21 Zelllinie, **2:** PYC2-rhuEPO Zellen aus dem Intervall R3 sortiert. **3:** Kontroll-rhuEPO Zellen ebenfalls aus dem Intervall R3. Die aufgetragenen Mengen in 2 und 3 betragen etwa 3 ng.

### 3.3.3 Untersuchung der rhuEPO Struktur

Die exprimierten rhuEPO Moleküle in den PYC2 transfizierten Zellen sollten sich von ihrer Proteinkettenzusammensetzung und der Glycosylierung nicht von den rhuEPO Molekülen der Kontrollzellen unterscheiden. Dazu wurde das rhuEPO aus Kulturüberständen mit Hilfe der Immunaффinitätssäule aufgereinigt und anschließend zur Entfernung der N-Glykane einem PNGase F-Verdau unterworfen. Durch eine SDS-PAGE Analyse der verdauten rhuEPO Proben wurde überprüft, ob die N-Glycosylierung in dem von den PYC2 sowie Kontrollzellen hergestellten rhuEPO vorhanden ist. Ein Vergleich der de-N-glycosylierten rhuEPO-Banden mit denen des verwendeten rhuEPO Standards gibt Aufschluß über die Vollständigkeit der rhuEPO Proteinkette sowie über O-Glycosylierungen (s. Abb. 3.3.3). Die unverdauten rhuEPO Moleküle, die von den PYC2 sowie Kontrollkulturen stammten, hatten im Vergleich zueinander die gleiche Größe und lagen ebenfalls im Größenbereich des Standard-rhuEPO (vgl. Abb. 3.3.2). Somit waren die exprimierten rhuEPO Moleküle glycosyliert.



**Abb. 3.3.3** PNGase F-Verdau von aufgereinigten rhuEPO Proben. **1:** Standard-rhuEPO aus einer rekombinanten BHK-Zelllinie. **2:** rhuEPO aus der Kontrollkultur. **3:** rhuEPO aus der PYC2 exprimierenden Kultur. Die teilweise punktuelle Konzentrierung der EPO Banden sind auf Inhomogenitäten im Gel zurückzuführen.

Die mit PNGase F verdaute Standard Probe ließ sich in zwei deutliche Banden zu 21 und 20 kDa sowie eine weitere leichtere Bande auftrennen. Die 20 kDa Bande repräsentiert das vollkommen deglycosylierte rhuEPO, während die schwerere Bande mit einer apparenten Molmasse von 21 kDa noch eine O-Glycosylierung am Ser126 enthält. Beide Banden ließen sich ebenfalls in den PNGase F-verdauten Proben der Kontroll- und PYC2 exprimierenden Kultur nachweisen. Das deutet darauf hin, daß das

unglycosylierte rhuEPO Protein, welches in den zwei BHK-Vergleichskulturen exprimiert wurde, etwa die gleiche Größe hat wie der Standard. Außerdem zeigt dieses Ergebnis, daß das rhuEPO der beiden Vergleichskulturen sowohl N- als auch O-glycosyliert ist. Bei der PYC2 exprimierenden Kultur sowie der Kontrollkultur trat zusätzlich zu der deglycosylierten und O-glycosylierten rhuEPO-Bande eine dritte Bande, kleiner als 20 kDa auf, die im Vergleich zum Standard eine deutlich höhere Intensität aufwies. Da diese Bande sowohl in der PYC2 exprimierenden als auch in der Kontrollkultur mit etwa der gleichen Intensität auftrat, kann man ausschließen, daß es sich um einen Einfluß der rekombinanten PYC2 handelt. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten dieser Bande könnten proteolytische Abbauaktivitäten während der Ernte und Aufreinigung des Kulturüberstandes sein, die zu Degradierungen des Produktes geführt haben könnten.

### **3.3.4 Untersuchung der rhuEPO exprimierenden Zellen in Batchkulturen**

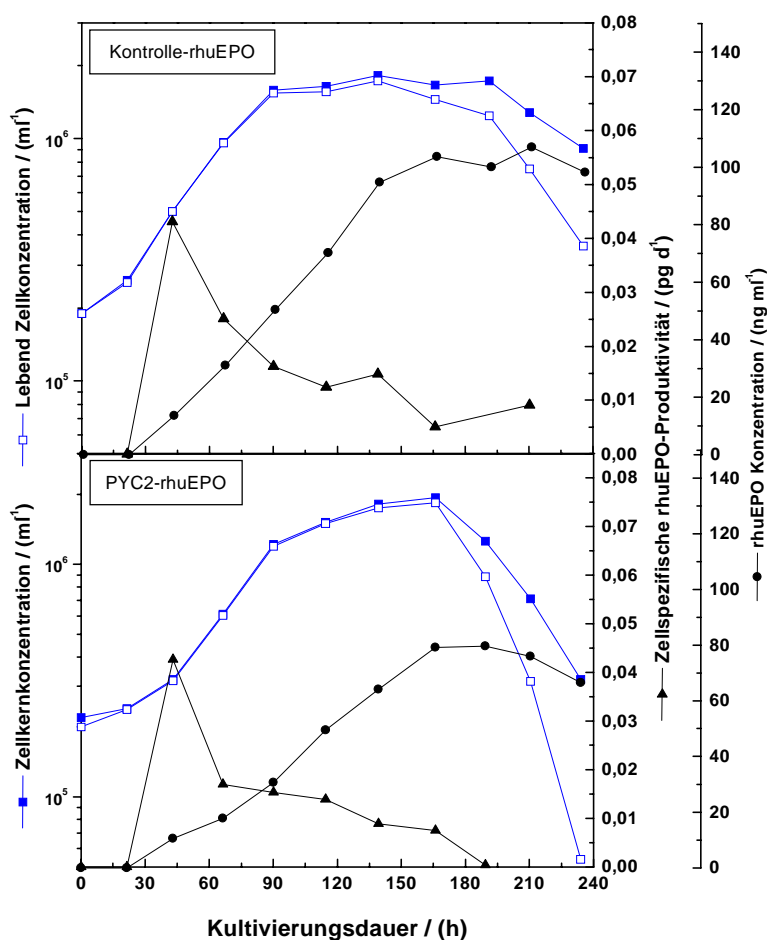
#### **3.3.4.1 Wachstum und rhuEPO-Produktion**

Das Wachstum und die rhuEPO-Produktion der sortierten Zellen wurde von Herrn Alejandro Beccaria in Batchkulturen untersucht (s. Abb. 3.3.4.1). Beide Kulturen wuchsen während der exponentiellen Phase mit gleichen Wachstumsraten von etwa  $0,63 \text{ d}^{-1}$ . Da jedoch die PYC2 exprimierende Kultur eine verlängerte Adaptationsphase aufwies, die ungefähr für die ersten 45 h der Kultivierung andauerte, betrug die Wachstumsrate der gesamten Wachstumsphase in der PYC2 exprimierenden Kultur  $0,55 \text{ d}^{-1}$  gegenüber der Kontrolle mit  $0,63 \text{ d}^{-1}$ . Die maximal erreichten Zellkonzentrationen in der stationären Wachstumsphase unterschieden sich in den beiden Kulturen nur unwesentlich voneinander. Die Kontrollkultur ging nach bereits 139 h in die Absterbephase über, während die PYC2 exprimierende Kultur einen Tag später nach ca. 166 h in die Absterbephase trat. Die rhuEPO-Konzentrationen nahmen in beiden Kulturen mit der Zeit linear zu und erreichten ihr Maximum von  $103 \text{ ng ml}^{-1}$  in der Kontrollkultur bzw.  $79 \text{ ng ml}^{-1}$  in der PYC2-rhuEPO Kultur jeweils kurz vor der Absterbephase. Die zellspezifischen rhuEPO-Produktionsraten in beiden Kulturen erreichten ihr Maximum nach 43 h mit etwa  $0,042 \text{ pg d}^{-1}$  und fielen danach ab. Die

PYC2 exprimierende Kultur hatte dabei eine steilere Produktivitätsabnahme.

### 3.3.4.2 Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten. rhuEPO-Ausbeute pro verbrauchte Glucoseeinheiten

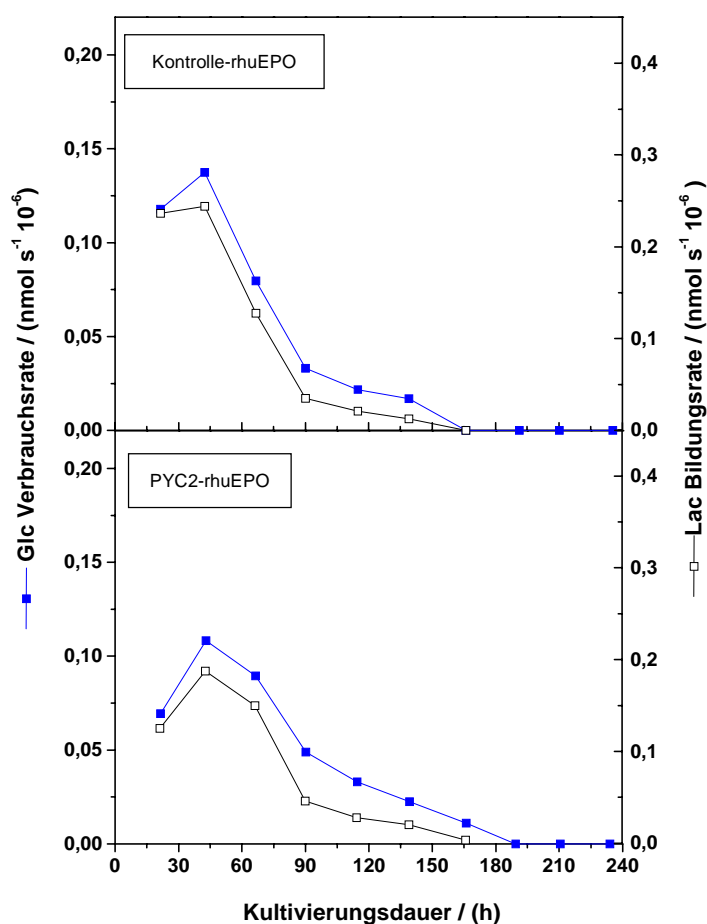
Die zellspezifischen Glucoseverbrauchsrate lagen in der PYC2 exprimierenden Kultur wie in den zuvor durchgeführten Versuchen niedriger als in der Kontrollkultur. Die Kontrolle hatte einen zellspez. Glucosebedarf von  $0,12 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$ , während die PYC2 exprimierende Kultur einen zellspez. Glucoseverbrauch von  $0,06 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  aufwies (s. Abb. 3.3.4.2a). Die Lactatbildungsrate der Kontrolle war analog zu den Glucoseverbrauchsrate ebenfalls erhöht. Die Kontrolle produzierte  $0,24 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  Lactat, während die PYC2 exprimierenden Kultur eine maximale Lactatproduktionsrate von  $0,18 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  aufwies.



**Abb. 3.3.4.1**

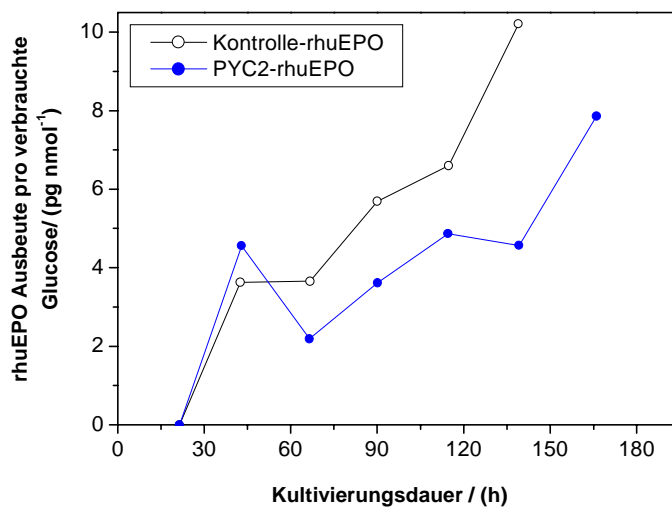
Verlauf der Zell- und der rhuEPO-Konzentrationen während einer Batch-kultivierung. Die Zellen wuchsen mit einer Wachstumsrate von  $0,63 \text{ d}^{-1}$  in der Kontrolle-rhuEPO Kultur und  $0,55 \text{ d}^{-1}$  in der PYC2-rhuEPO Kultur. Die rhuEPO-Konzentration erreichte einen maximalen Wert von  $103 \text{ ng ml}^{-1}$  in der Kontrolle-rhuEPO Kultur und  $79 \text{ ng ml}^{-1}$  in der PYC2-rhuEPO Kultur. Die zell-spezifische rhuEPO-Produktionsrate erreichte nach 43 h in beiden Kulturen ein Maximum von etwa  $0,042 \text{ pg d}^{-1}$  und fiel danach ab.

Wie in Abbildung 3.3.4.2b dargestellt, nimmt die Produktausbeute je verbrauchte Glucose in beiden Kulturen im Laufe der Kultivierung zu. Eine Erklärung hierfür ist die mit abnehmender Glucosekonzentration im Medium sinkende zellspez. Glucoseverbrauchsrate (s. Abb. 3.3.4.2.a) bei gleichbleibender rhuEPO-Produktivität. Die Produktausbeute in der Kontrollkultur war nahezu während der gesamten Kultivierung höher und erreichte gegen Ende der Kultivierung eine 1,6 fach bessere Produktausbeute als die PYC2 exprimierende Kultur.



**Abb. 3.3.4.2a**

Zellspezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungs-raten. Die PYC2 exprimierende Kultur zeigte zu Anfang der Kultivierung mit 0,06 und 0,11 nmol s<sup>-1</sup> 10<sup>-6</sup> deutlich geringere Glucoseverbrauchs-raten als die Kontrolle-rhuEPO Kultur (Kontrolle) mit 0,12 und 0,14 nmol s<sup>-1</sup> 10<sup>-6</sup>. Die zellspez. Lactatbildungs-raten verliefen parallel zu den zellspez. Glucoseverbrauchs-raten.

**Abb. 3.3.4.2b**

Verlauf der rhuEPO-Ausbeute pro verbrauchter Glucose. Die rhuEPO-Ausbeute nimmt in beiden Kulturen im Verlauf der Kultivierung zu. Die Kontrolle hat dabei in der Phase von 67 und 114 Kultivierungsstunden eine 1,6-fach höhere Produktausbeute als die PYC2-exprimierende Kultur.

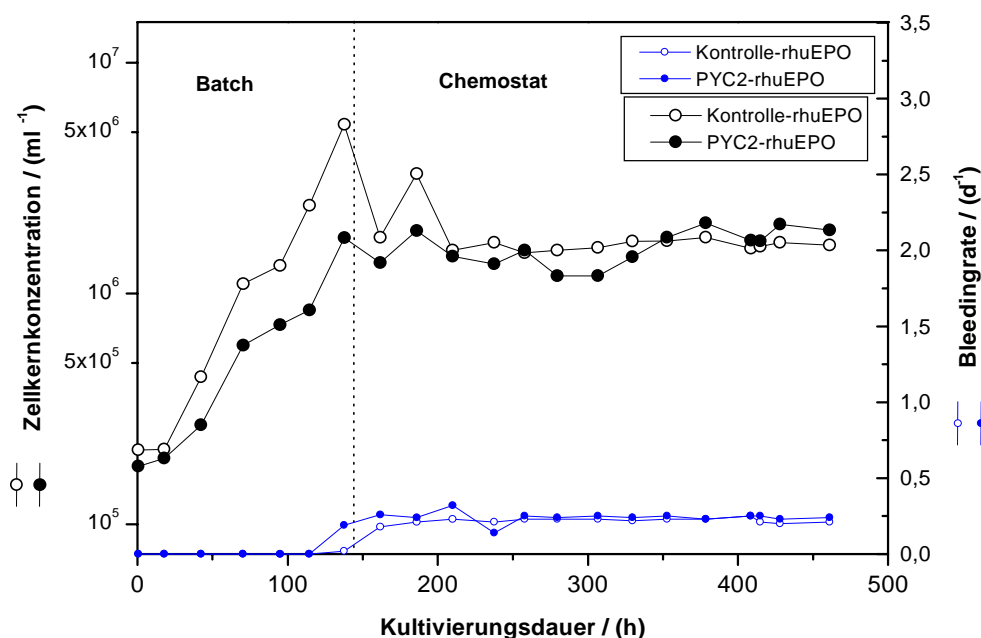
### 3.3.5 Vergleich der rhuEPO exprimierenden Zellen im Chemostaten

#### 3.3.5.1 Zellwachstum

Die Zellen wurden zunächst im Batchmodus kultiviert, und anschließend wurde der Bioreaktor auf Chemostat Modus umgestellt (s. Abb. 3.3.5.1). Hierbei durfte die Rate, mit der Zellsuspension aus dem Fermenter entfernt wurde (Bleedingrate), die maximale Wachstumsrate nicht überschreiten, da es sonst zu einer Verarmung der Zellen im Fermenter kommen würde ( $D_{\max} = \mu_{\max}$ ). Als Bleedingrate wurde die zuvor für die PYC2-rhuEPO Kultur als maximal erreichbare Wachstumsrate von  $0,2 \text{ d}^{-1}$  gewählt.

#### 3.3.5.2 Zellspezifische rhuEPO-Produktivität und rhuEPO-Ausbeute pro verbrauchter Glucose

Im Batch hatten die Kulturen unterschiedliche maximale Wachstumsraten mit  $0,33 \text{ d}^{-1}$  in der Kontrollkultur und  $0,22 \text{ d}^{-1}$  in der PYC2-exprimierenden Kultur. Gegen Ende des Satzbetriebes (Batchphase) erreichten die Kulturen unterschiedliche Zellzahlen, jedoch stellte sich in der Gleichgewichtsphase des Chemostaten für beide Kulturen eine identische mittlere Zellkonzentration von  $1,6 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  ein (s. Abb. 3.3.5.1).



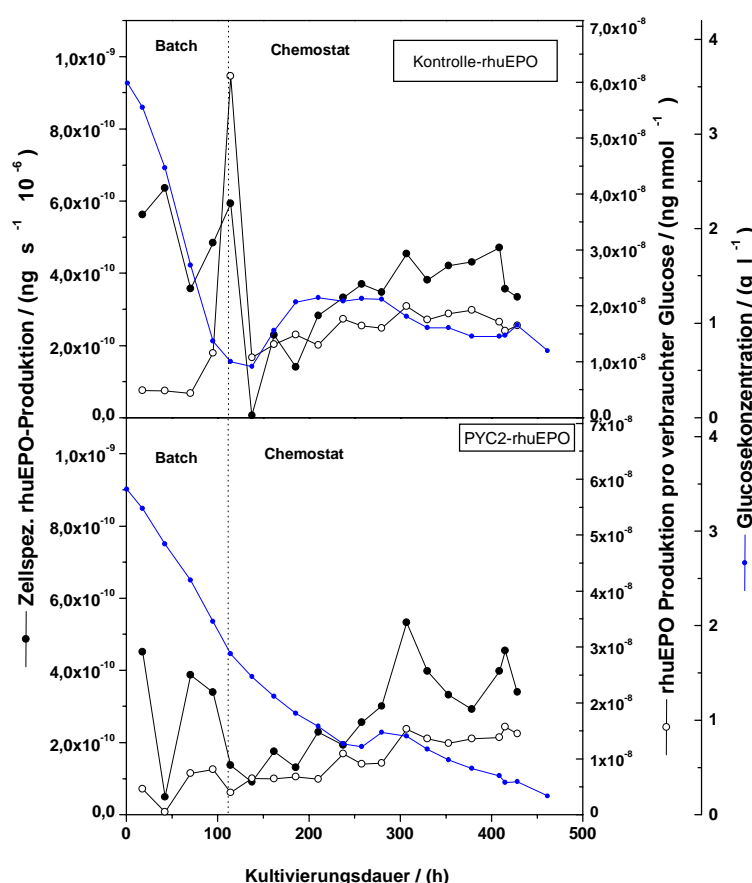
**Abb. 3.3.5.1** Verlauf der Zellkonzentration im Chemostatreaktor. Die Kontrollkultur wächst im Batch mit einer höheren Wachstumsrate. Am Ende der Batchphase erreicht die Kontrollkultur eine Zellkonzentration von  $2,4 \times 10^6$ . Die PYC2 exprimierende Kultur erreicht im gleichen Zeitraum eine Zellkonzentration von  $1,6 \times 10^6$  ml<sup>-1</sup>. In der Gleichgewichtsphase des Chemostaten haben beide Kulturen eine ähnliche Zellkonzentration von  $1,6 \times 10^6$  ml<sup>-1</sup>.

Die zellspezifischen rhuEPO-Produktionsraten verzeichneten in beiden Kulturen während der Chemostatkultivierung eine kontinuierliche Zunahme (s. Abb. 3.3.5.2). In der Kontrollkultur stieg die zellspez. rhuEPO-Produktion von  $6,15 \times 10^{-12}$  ng s<sup>-1</sup> 10<sup>-6</sup> am Ende des Satzbetriebes auf einen maximalen Wert von  $4,71 \times 10^{-10}$  ng s<sup>-1</sup> 10<sup>-6</sup> gegen Ende der Fermentation an. In der PYC2 exprimierenden Kultur stieg die zellspez. rhuEPO-Produktivität von  $1,37 \times 10^{-10}$  auf  $4,54 \times 10^{-10}$  ng s<sup>-1</sup> 10<sup>-6</sup> gegen Ende der Chemostatphase. Insgesamt hatte die PYC2 exprimierende Kultur eine etwas geringere mittlere zellspez. rhuEPO-Produktivität mit  $3,21 \times 10^{-10}$  ng s<sup>-1</sup> 10<sup>-6</sup> gegenüber der Kontrolle mit  $3,51 \times 10^{-10}$  ng s<sup>-1</sup> 10<sup>-6</sup>.

Der Verlauf der Glucosekonzentration in beiden Kulturüberständen zeigt, daß die Glucose in der Kontrollkultur, besonders während der Batchphase, wesentlich schneller



verzehrt wurde als in der PYC2 exprimierenden Kultur. Am Ende der Batchphase befand sich die Kontrollkultur im Gegensatz zur PYC2 exprimierenden Kultur in einer Glucoselimitierung mit Konzentrationen unterhalb von  $1 \text{ g l}^{-1}$ . Im Chemostaten stieg die Glucosekonzentration wieder auf einen stabilen Wert um  $1 \text{ g l}^{-1}$  an.



**Abb. 3.3.5.2**

Verlauf der zellspezifischen rhuEPO-Produktivität sowie der rhuEPO-Produktivität pro verbrauchter Glucose für Kontroll-rhuEPO sowie PYC2-rhuEPO Zellkulturen in einem Chemostaten. Ebenfalls dargestellt ist die Glucosekonzentration im Kulturüberstand.

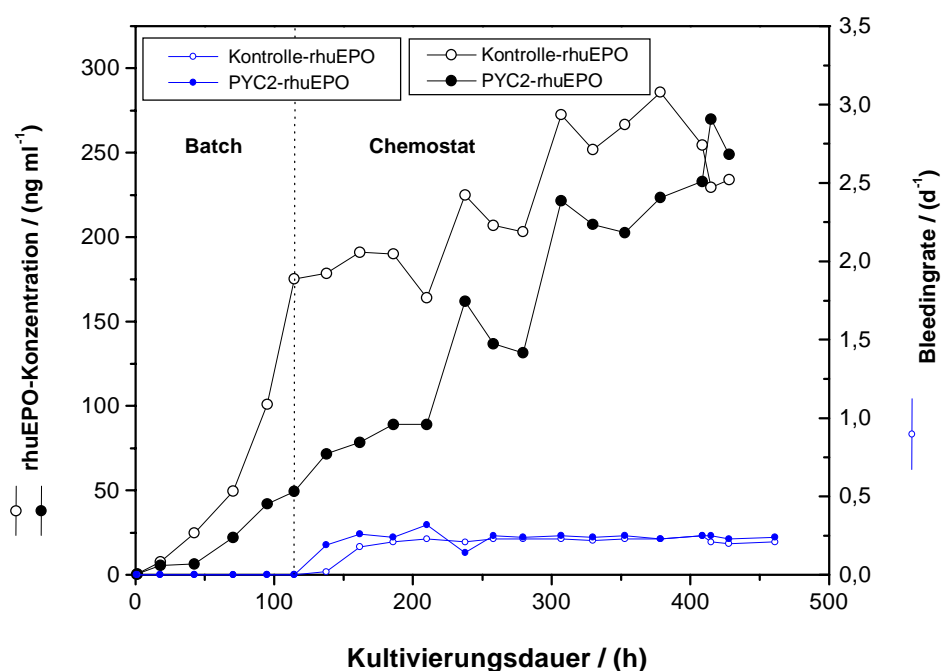
Die PYC2 exprimierende Kultur zeigte eine stetige Abnahme der Glucosekonzentration, die sich über beide Phasen der Kultivierung erstreckte. In der Gleichgewichtsphase der Kultivierung war die Glucosekonzentration teilweise unterhalb von  $1 \text{ g l}^{-1}$ .

Die rhuEPO-Ausbeute pro verbrauchter Glucose hatte in der Kontrollkultur während der Batchphase einen konstanten Wert von  $4,67 \times 10^{-9} \text{ ng nmol}^{-1}$ . Gegen Ende der Batchphase jedoch wurde ein Maximum von  $6,11 \times 10^{-8} \text{ ng nmol}^{-1}$  erreicht, was auf eine hohe zellspezifische rhuEPO-Produktivität bei einer gleichzeitig minimalen

Glucoseverbrauchsrate (s. Abb. 3.3.5.4) zurückzuführen ist. Während der Chemostatkultivierung erreichte die Ausbeute einen konstanten Wert von  $1,61 \times 10^{-8}$  ng nmol<sup>-1</sup>. Die rhuEPO pro Glucose-Ausbeute in der PYC2 exprimierenden Kultur lag mit einer mittleren rhuEPO-Ausbeute von  $1,1 \times 10^{-8}$  ng nmol<sup>-1</sup> während beider Kultivierungsphasen etwas niedriger.

### 3.3.5.3 Die Gesamt rhuEPO-Ausbeute

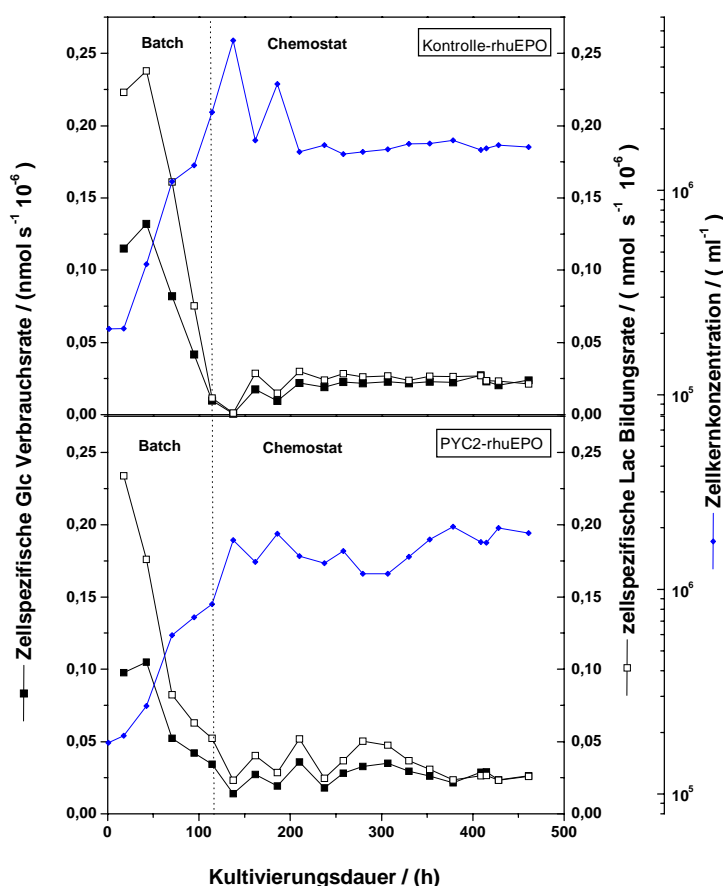
Die Gesamt rhuEPO-Ausbeute im Chemostaten kann direkt über die rhuEPO-Konzentration im Bleed berechnet werden, da die Bleedingraten in beiden Fermentern etwa gleich waren. Die Kontrollkultur erreichte in den ersten 200 h der Kultivierung etwa die doppelte rhuEPO-Konzentration wie die PYC2 exprimierende Kultur (s. Abb. 3.3.5.3). Im späteren Verlauf der Fermentation erfuhr die PYC2 exprimierende Kultur eine Steigerung der rhuEPO-Konzentration. Insgesamt lagen die rhuEPO-Konzentrationen in der PYC2 exprimierenden Kultur jedoch immer niedriger als in der Kontrolle und somit war der rhuEPO Gewinn in der Kontrolle wesentlich höher.



**Abb. 3.3.5.3** Verlauf der Bleedingrate sowie der rhuEPO-Konzentration im Bleed für beide Bioreaktoren. Da die Bleedingrate in beiden Kulturen nahezu identisch war, kann von der rhuEPO-Konzentration auf die gesamte rhuEPO-Ausbeute geschlossen werden.

### 3.3.5.4 Zellspezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten

Die zellspezifischen Glucoseverbrauchsrate waren in beiden Kulturen zu Anfang der Batchphase mit  $0,12 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  in der Kontrollkultur und  $0,10 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  in der PYC2 exprimierenden Kultur ähnlich. Analog dazu waren die zellspez. Lactatbildungsraten mit  $0,23$  und  $0,21 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  zur Beginn der Kultivierung ebenfalls nahezu identisch (s. Abb. 3.3.5.4). In der Gleichgewichtsphase lagen die zellspez. Glucoseverbrauchsrate bei  $0,022$  und  $0,027 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  für die Kontroll- bzw. PYC2 exprimierende Kultur. Die zellspez. Lactatbildungsraten lagen im Mittel bei  $0,025 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  für die Kontrolle und bei  $0,032 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  in der PYC2 exprimierenden Kultur. Insgesamt kann man sagen, daß sich die zellspez. Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten nur unwesentlich voneinander unterschieden haben.

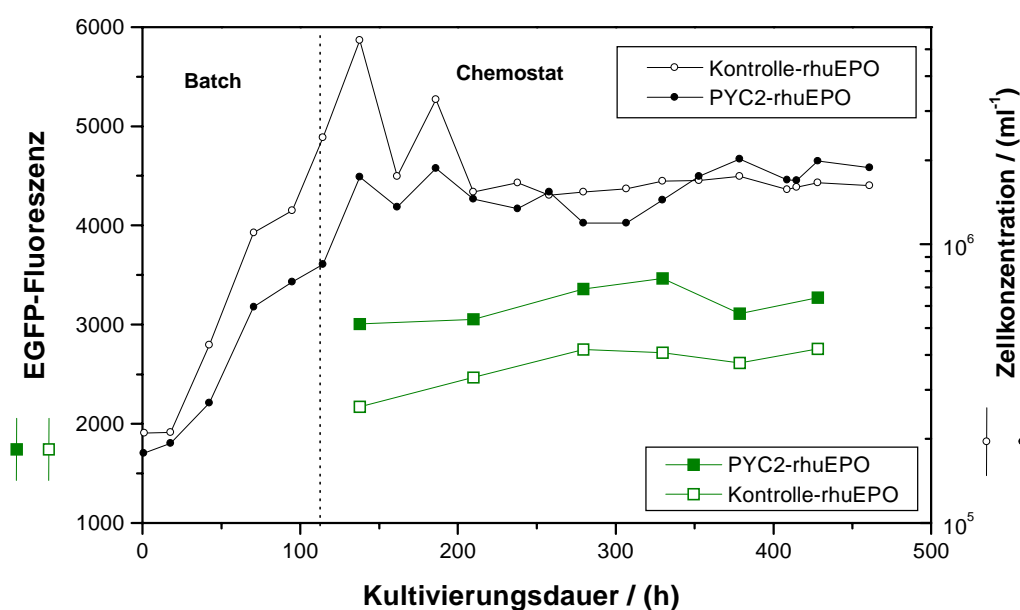


**Abb. 3.3.5.4**

Verlauf der zellspezifischen Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten in Chemostatkulturen von den BHK-21 A Zellen PYC2-rhuEPO und Kontrolle-rhuEPO. Die Raten unterschieden sich in beiden Kulturen nur unwesentlich voneinander.

### 3.3.6 Wie stabil sind die Expressionsraten während einer Dauerkultivierung?

Die regelmäßige FACS-Analyse von Proben aus einer Chemostatkultivierung ohne Antibiotikazusatz ließ Rückschlüsse auf das Expressionsverhalten von transfizierten Zellen ziehen. Dabei wurde die EGFP-Fluoreszenz als Maß für die Expression herangezogen (s. Abb. 3.3.6). Es hat sich für die mit dem bicistronischen Vektor transfizierten Zellen gezeigt, daß die EGFP-Expression im Laufe der Kultivierung nicht zurückgegangen ist, sondern sogar eine leichte Zunahme erfahren hat. Auch die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der Zellen über den Kultivierungszeitraum zeigte, daß die Zellen ihre Fluoreszenzfähigkeit beibehielten. Somit können alle Ergebnisse aus Fermentationsversuchen unter der Annahme einer stabilen rhuEPO-Expression interpretiert werden.

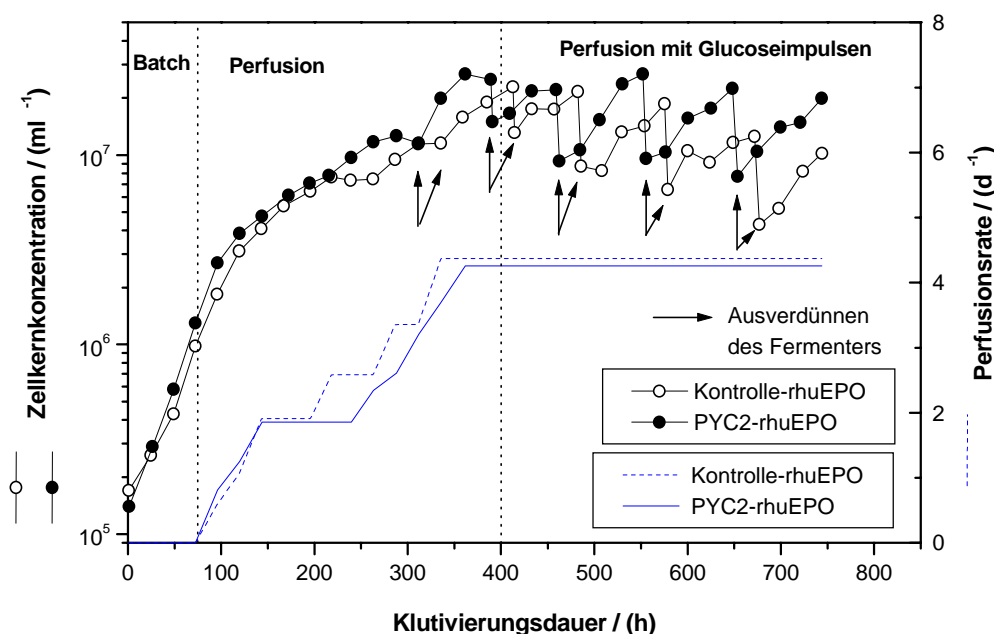


**Abb. 3.3.6** Verlauf der EGFP-Fluoreszenz der Zellen in einer Chemostatkultur. Die dargestellte EGFP-Fluoreszenz ist ein relativer Wert, der die Summe der EGFP-Fluoreszenzstärke in einem bestimmten Intervall angibt. Die Untersuchung der EGFP-Fluoreszenz im FACS soll die Stabilität der Zellen während der nahezu dreiwöchigen Kultivierungsphase im Bioreaktor zeigen. Die Zellen veränderten ihre Fluoreszenzfähigkeit im Lauf der Kultivierung kaum, was auf eine stabile Integration des bicistronischen Vektors ins Genom hindeutet.

### 3.3.7 Produktivität des rhuEPO im Perfusionsreaktor

#### 3.3.7.1 Wachstumsverhalten

Die Produktivität der rhuEPO exprimierenden Zellen in einem 2,5 l Perfusionsreaktor wurde von Herrn Alejandro Beccaria untersucht. Dazu wurden die Zellen zunächst im Batchmodus kultiviert und der Fermenter anschließend auf Perfusionsbetrieb umgestellt (s. Abb. 3.3.7.1). Die Perfusionsrate wurde langsam erhöht, bis eine Zellkonzentration von  $1,26 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$  erreicht wurde. Dabei wurde die Perfusionsrate so gewählt, daß sich identische Zellkonzentrationen in beiden Bioreaktoren einstellten. Anschließend wurden beide Fermenter bei einer konstanten Perfusionsrate von  $4,37 \text{ d}^{-1}$  weiterkultiviert. In regelmäßigen Abständen wurde die Perfusion kurzzeitig abgestellt, es wurde Zellsuspension aus dem Reaktor entnommen und der Fermenter bei maximaler Befüllungsrate wieder mit frischem Medium aufgefüllt. Im Anschluß daran wurden beide Reaktoren wieder mit einer Rate von  $4,37 \text{ d}^{-1}$  perfundiert.



**Abb. 3.3.7.1** Verlauf der Zellkonzentration und der Perfusionsrate in einem 2,5 l Bioreaktor. Die Zellen wurden zunächst in Batch und anschließend im Perfusionsmodus kultiviert. Nach ca. 400 h wurde die Glucosekonzentration im Fermenter mehrmals impulsartig erhöht.

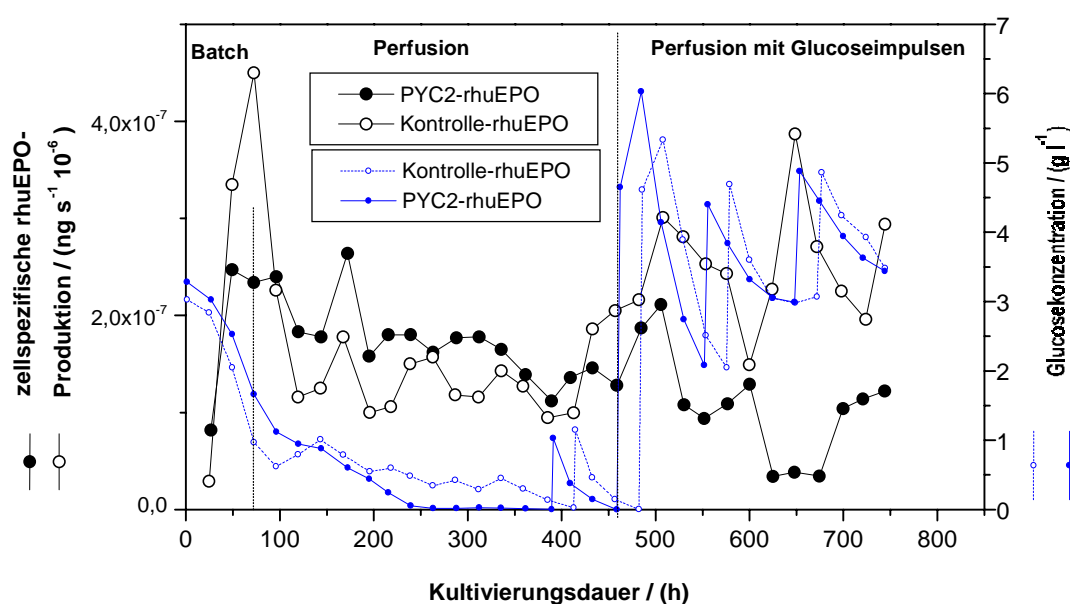
Dieser Vorgang des Ausverdünnens des Fermenters war nötig, um die Zellkonzentration im Fermenter zu verringern, und ein kontinuierliches Wachstum zu ermöglichen. Nach ungefähr 400 Kultivierungsstunden wurden wiederholt kurzzeitig hohe Glucosekonzentrationen in dem Fermenter durch den Zusatz von Glucose-supplementiertem Medium aus der Inokulumflasche erzeugt. Diese impulsartigen Glucosezugaben (Glucoseimpuls) in den Fermenter sollen Aufschluß über die Produktivität der rhuEPO exprimierenden Zellen unter verschiedenen Glucosekonzentrationen geben.

Beide Kulturen wuchsen bei zunächst identischen Perfusionsraten mit gleichen Wachstumsraten. Nach 200 h, bei einer Perfusionsrate von etwa  $2 \text{ d}^{-1}$ , mußte die Perfusion in der PYC2 exprimierenden PYC2-rhuEPO Kultur gegenüber der Vergleichskultur geringfügig erniedrigt werden, um ein stärkeres Wachstum des ersteren im Vergleich zur Kontrolle-rhuEPO Kultur zu vermeiden. Dennoch erreichte die PYC2-rhuEPO Kultur regelmäßig höhere Zellkonzentrationen.

### **3.3.7.2 Zellspezifische rhuEPO-Produktionsraten. Gibt es eine Abhängigkeit der rhuEPO-Produktion von der Glucosekonzentration?**

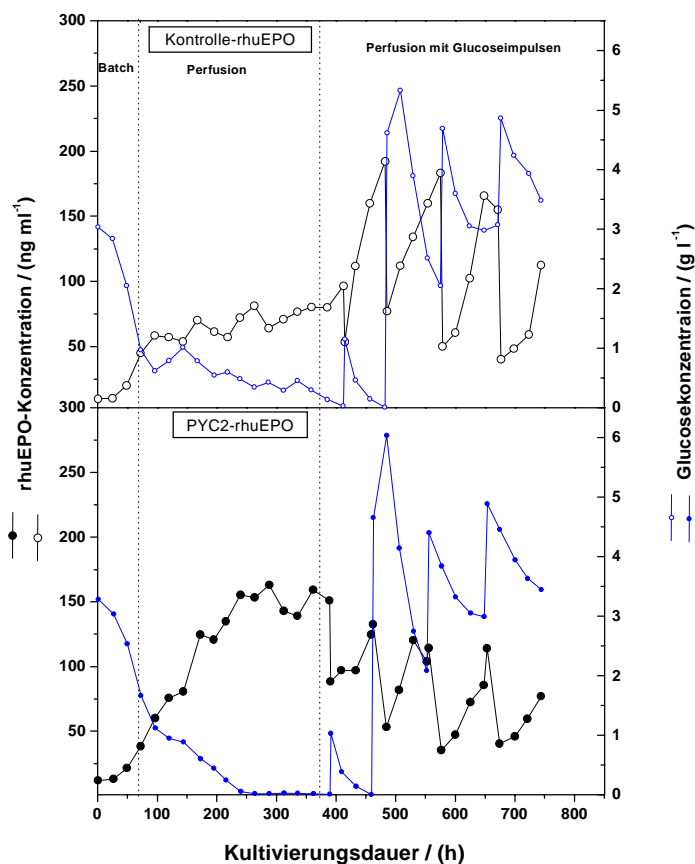
Die zellspezifische rhuEPO-Produktion zeigte in den verschiedenen Phasen der Fermentation einen unterschiedlichen Verlauf. Innerhalb der Batchphase nahm die Produktivität von einem anfänglich niedrigem Wert in beiden Kulturen kontinuierlich zu. Die Kontrolle-rhuEPO Kultur erreichte dabei am Ende der Batchperiode mit  $4,5 \times 10^{-7} \text{ ng s}^{-1} 10^6$  etwa die zweifache zellspez. Produktivität wie die PYC2-rhuEPO Kultur (s. Abb. 3.3.7.2a). Mit dem Einschalten der Perfusion nahm die zellspez. rhuEPO-Produktivität in beiden Kulturen deutlich ab. Während der Perfusionsphase ohne Glucosezugaben (zwischen Kultivierungsstunden 100 und 400) hatte die PYC2 exprimierende PYC2-rhuEPO Kultur mit  $1,73 \text{ ng s}^{-1} 10^6$  eine höhere zellspezifische Produktivität als die Kontrollkultur Kontrolle-rhuEPO. Die Glucosekonzentrationen lagen zu diesem Zeitpunkt in beiden Kulturen deutlich unterhalb von  $1 \text{ g l}^{-1}$ . Nach ca. 400 h wurde der erste Glucoseimpuls in den Fermenter gegeben, danach wurden die Glucoseimpulse wiederholt, so daß sich jeweils maximale Glucosekonzentrationen zwischen 5 und  $6 \text{ g l}^{-1}$  einstellten. Die Kontrolle-rhuEPO Kultur reagierte darauf mit großen Produktivitäts-

steigerungen, während die PYC2-rhuEPO Kultur nur geringfügige Produktivitätszunahmen verzeichnete. Der Verlauf der rhuEPO-Produktivität in Abhängigkeit von



**Abb. 3.3.7.2a** Verlauf der zellspezifischen rhuEPO-Produktivität sowie der Glucosekonzentration im Kulturüberstand in der PYC2-rhuEPO und der Kontrolle-rhuEPO Kultur. Ab 400 Kultivierungsstunden wurden mehrmals Glucoseimpulse in den Fermenter gegeben. Es wurden dabei im Kulturüberstand Glucosekonzentrationen bis zu  $6 \text{ g l}^{-1}$  erreicht.

der Glucosekonzentration lässt für die Kontrollkultur eine Abhängigkeit der Produktivität von der Glucosekonzentration im Medium vermuten. Die rhuEPO-Konzentrationen im Kulturüberstand (s. Abb. 3.3.7.2b) waren während der ersten 100 h der Kultivierung, d.h. innerhalb der Batchphase, nahezu identisch. Im mittleren Bereich der Fermentation unter glucoselimitierten Bedingungen erreichte die PYC2-rhuEPO Kultur eine durchschnittliche rhuEPO-Konzentration von  $138,6 \text{ ng ml}^{-1}$ , während die Kontrollkultur nur etwa die Hälfte der rhuEPO-Konzentration von durchschnittlich  $69,7 \text{ ng ml}^{-1}$  erreichte.

**Abb. 3.3.7.2b**

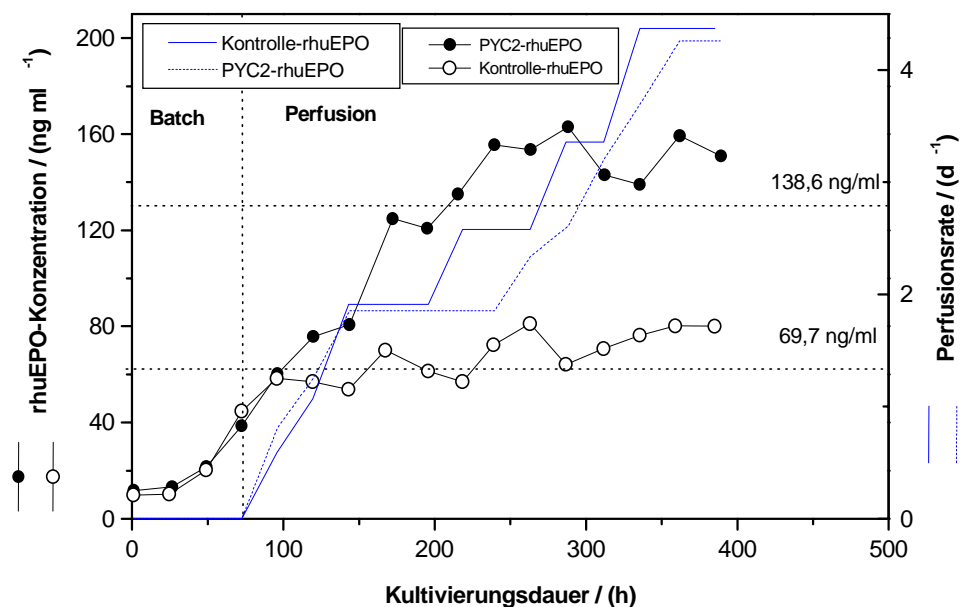
Verlauf der rhuEPO- und Glucosekonzentrationen für die PYC2-rhuEPO und die Kontrolle-rhuEPO Kultur im Perfusionsreaktor.

Bei Supplementierung des Kulturmediums mit Glucose konnte die rhuEPO-Konzentration in der Kontrollkultur mit Werten um  $192 \text{ ng ml}^{-1}$  gegenüber  $132 \text{ ng ml}^{-1}$  in der PYC2 exprimierenden Kultur deutlich gesteigert werden. Die periodische Abnahme der rhuEPO-Konzentration ist auf das Ausverdünnen zurückzuführen, bei der ein Teil des produzierten rhuEPO mit der Zellsuspension aus dem Fermenter entfernt wird und die im Fermenter verbleibende rhuEPO-Menge durch die Zugabe von frischem Medium verdünnt wird.

### 3.3.7.3 Gesamtausbeute von rhuEPO

Abbildung 3.3.7.3 zeigt die ersten 391 Kultivierungsstunden der Fermentation. Innerhalb der ersten Perfusionsphase, zwischen den Kultivierungsstunden 72 und 391, erreicht die PYC2-rhuEPO Kultur mit  $10,38 \text{ mg}$  die doppelte Gesamtausbeute an





**Abb. 3.3.7.3** Darstellung der mittleren rhuEPO-Konzentration und der Perfusionsrate im kontinuierlich perfundierten Bioreaktor bis zur Kultivierungsstunde 391. Die PYC2-rhuEPO Kultur erreicht in der Perfusionsphase zwischen 72 und 391 Kultivierungsstunden nahezu die doppelte rhuEPO-Konzentration im Überstand wie die Kontrollkultur Kontrolle-rhuEPO. Die Gesamtausbeute des rhuEPO während dieser Periode beträgt für die PYC2-rhuEPO Kultur 10,38 mg gegenüber 5,78 mg für die Kontrolle. Die Berechnung der Ausbeuten ist in Abschnitt 2.7.3 beschrieben.

rhuEPO wie die Kontrolle-rhuEPO Kultur mit nur 5,78 mg. Bei Glucosezugabe erreicht die Kontrollkultur wiederum höhere Erträge.

### 3.3.7.4 Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten

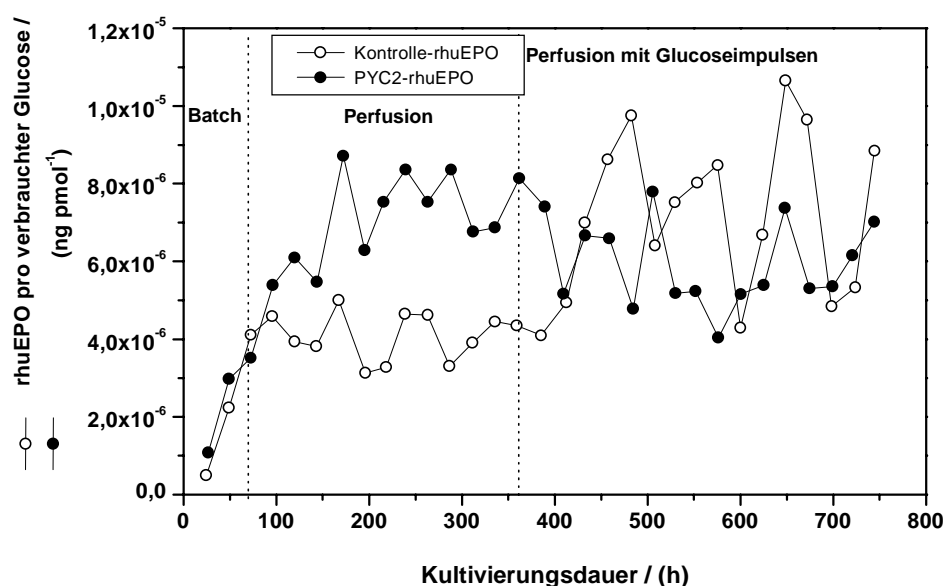
Die zellspez. Glucoseverbrauchs- sowie die Lactatbildungsraten waren im Batchmodus in der PYC2-rhuEPO Kultur auf etwa die Hälfte reduziert (s. Tab. 3.3.7.4). In der Perfusionsphase war der zellspez. Glucoseverbrauch um ungefähr ein Drittel geringer. Die zellspez. Lactatbildungsraten verhielten sich ähnlich.

**Tab. 3.3.7.4** Übersicht über die zellspez. Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten von PYC2-rhuEPO sowie Kontrolle-rhuEPO Kulturen im Batch- sowie Perfusionsbetrieb.

Fermentations- modus	zellspezifische Glc Verbrauchs- rate (nmol s <sup>-1</sup> 10 <sup>-6</sup> )		zellspezifische Lac Bildungs- rate (nmol s <sup>-1</sup> 10 <sup>-6</sup> )	
	PYC2-rhuEPO	Kontrolle-rhuEPO	PYC2-rhuEPO	Kontrolle-rhuEPO
Batch	0,08	0,15	0,14	0,27
Perfusion	0,02	0,03	0,019	0,04

**3.3.7.5 rhuEPO-Ausbeute pro verbrauchter Glucose**

Die rhuEPO-Ausbeute pro verbrauchter Glucose (s. Abb. 3.3.7.5) hatte einen ähnlichen Verlauf wie die rhuEPO-Konzentration im Kulturüberstand (s. Abb. 3.3.7.2b). Während der Batchperiode waren die Verläufe für beide Kulturen identisch. In den ersten 300 h der Perfusion bei einer Glucoselimitierung war die rhuEPO-Ausbeute in der PYC2-rhuEPO Kultur mit  $6,9 \times 10^{-6}$  ng pmol<sup>-1</sup> im Mittel etwa doppelt so hoch wie in der Kontrolle-rhuEPO Kultur. In der letzten Phase der Fermentation mit Zugabe von Glucoseimpulsen drehte sich das Verhältnis um, und die Kontrolle-rhuEPO Kultur erreichte mit Werten um  $7 \times 10^{-6}$  ng pmol<sup>-1</sup> deutlich höhere rhuEPO-Ausbeuten pro verbrauchter Glucose als die PYC2-rhuEPO Kultur, deren Ausbeute gegenüber der ersten Perfusionsphase auf  $5,8 \times 10^{-6}$  ng pmol<sup>-1</sup> im Mittel abnahm.

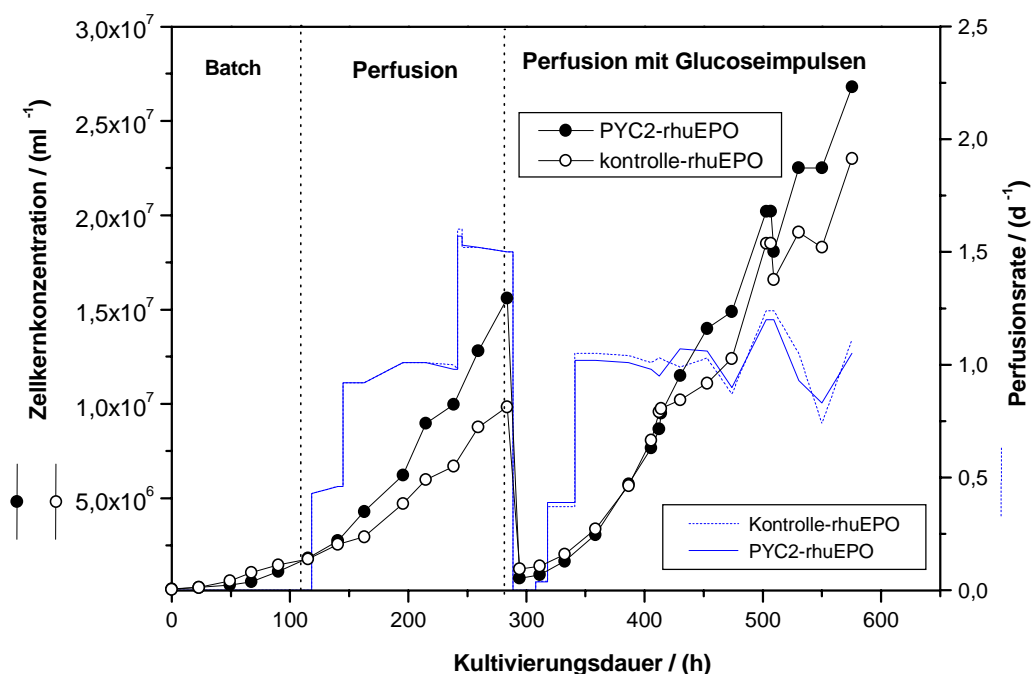


**Abb. 3.3.7.5** Verlauf der rhuEPO-Ausbeute pro verbrauchter Glucose für die PYC2-rhuEPO sowie die Kontrollkultur. Der Verlauf der rhuEPO-Ausbeute war dem Verlauf der rhuEPO-Konzentration im Kulturüberstand sehr ähnlich. Das rhuEPO/Glc Verhältnis bewegte sich in der PYC2-rhuEPO Kultur während der ersten Perfusionsphase um einen mittleren Wert von  $6,9 \times 10^{-6} \text{ ng pmol}^{-1}$ , was etwa der doppelten Ausbeute der Kontrolle-rhuEPO Kultur entsprach. Die Kontrollkultur reagierte bei einer Glucosezugabe mit einer nahezu Verdopplung des rhuEPO/Glc Verhältnisses.

### 3.3.8 Produktionsverhalten im Perfusionsreaktor bei identischen Perfusionsraten

#### 3.3.8.1 Wachstumsverhalten

Die mit dem bicistronischen EGFP-EPO Vektor transfizierten Zellen wurden erneut in einem Perfusionsreaktor kultiviert, diesmal jedoch bei identischen Perfusionsraten (s. Abb. 3.3.8.1). Die Kulturen wurden zunächst im Batchverfahren bis zu einer Zellkonzentration von  $1,7 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  kultiviert, und anschließend wurden beide Bioreaktoren mit frischem Medium perfundiert. Die Perfusionsrate wurde stufenweise bis auf  $1,6 \text{ d}^{-1}$  erhöht. Nach 288 h wurde der Fermenter bis auf 1/10 des Reaktorvolumens entleert und mit frischem Medium befüllt (Ausverdünnen). Im weiteren Verlauf wurden die Fermenter erneut perfundiert und in periodischen Zeitabständen wurden Glucoseimpulse hinzugegeben.

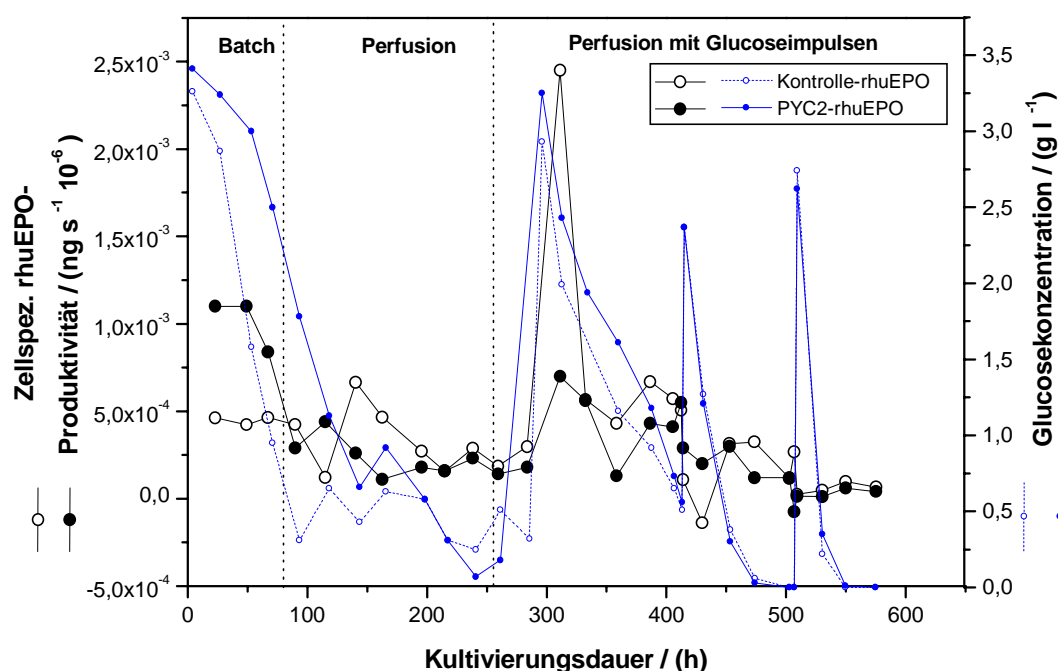


**Abb. 3.3.8.1** Verlauf der Zellkonzentration in einem kontinuierlich perfundierten Bioreaktor. Die PYC2-rhuEPO Kultur erreichte nach 288 h eine 1,5 fach höhere Zellkonzentration als die Kontrolle-rhuEPO Kultur.

Die PYC2-rhuEPO Kultur hatte direkt nach dem Übergang in den Perfusionsmodus eine höhere Wachstumsrate als die Kontrollkultur. Gegen Ende der ersten Perfusionsphase erreichte die PYC2-rhuEPO Kultur mit  $1,56 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$  eine 1,5 fach höhere Zellkonzentration gegenüber der Kontrollkultur, die lediglich eine Zellkonzentration von  $9,84 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  aufwies.

### 3.3.8.2 Zellspezifische rhuEPO-Produktivität und Glucosekonzentration im Kulturmedium

Am Anfang der Perfusionsphase lag die zellspezifische rhuEPO-Produktivität der Kontrollkultur mit Werten zwischen  $3,08 \times 10^{-4}$  und  $8,12 \times 10^{-4} \text{ ng s}^{-1} 10^{-6}$  höher als die der PYC2-rhuEPO Kultur, die im Mittel eine Produktivität von  $2 \times 10^{-4} \text{ ng s}^{-1} 10^{-6}$  aufwies (s. Abb. 3.3.8.2). Mit abnehmender Glucosekonzentration zwischen 200 und 300 Kultivierungsstunden glichen sich die Produktivitäten in beiden Kulturen an. Nach dem



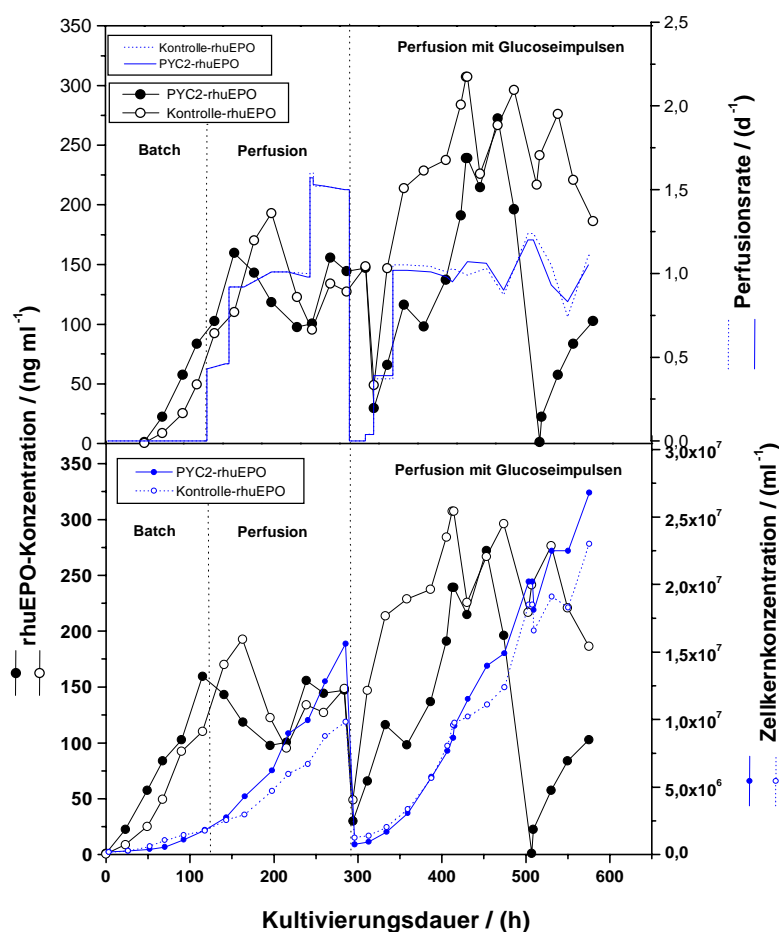
**Abb. 3.3.8.2** Verlauf der zellspezifischen rhuEPO-Produktivität. Im zweiten Abschnitt der Perfusion, ab 288 Kultivierungsstunden, wurden Glucoseimpulse in den Fermenter gegeben. Die Kontrolle-rhuEPO-Zellen reagierten auf die Glucosezufuhr mit einer deutlichen Steigerung der zellspezifischen rhuEPO-Produktivität. Die PYC2-rhuEPO Kultur dagegen zeigte kaum eine Reaktion.

Ausverdünnen der Reaktoren reagierte die Kontrolle-rhuEPO Kultur mit einer merklichen Steigerung der Produktivität und erreichte einen maximalen Wert von  $2,45 \times 10^{-3} \text{ ng s}^{-1} 10^{-6}$ . Die PYC2-rhuEPO Kultur dagegen reagierte nur mit einer unwesentlichen Produktivitätszunahme. Die Reaktion der rhuEPO-Produktivität beider Kulturen auf den zweiten und dritten Glucoseimpuls waren kaum wahrnehmbar. Gegen Ende der Fermentation ging die rhuEPO-Produktion in beiden Kulturen gegen einen Wert von null.

### 3.3.8.3 rhuEPO-Konzentration im Perfundat

Von der rhuEPO-Konzentration im Perfundat konnte direkt auf die Gesamtausbeute von rhuEPO geschlossen werden, da die Perfusionsraten in beiden Fermentern identisch waren (s. Abb. 3.3.8.3, oben). Während der Batchphase, in der das

Wachstum beider Kulturen nahezu identisch verlief (s. Abb. 3.3.8.3, unten), erreichte die PYC2-rhuEPO Kultur mit  $159 \text{ ng ml}^{-1}$  eine höhere rhuEPO-Konzentration gegenüber der Kontrollkultur mit  $110 \text{ ng ml}^{-1}$ . Nach Einsetzen der Perfusion fiel die



**Abb. 3.3.8.3**

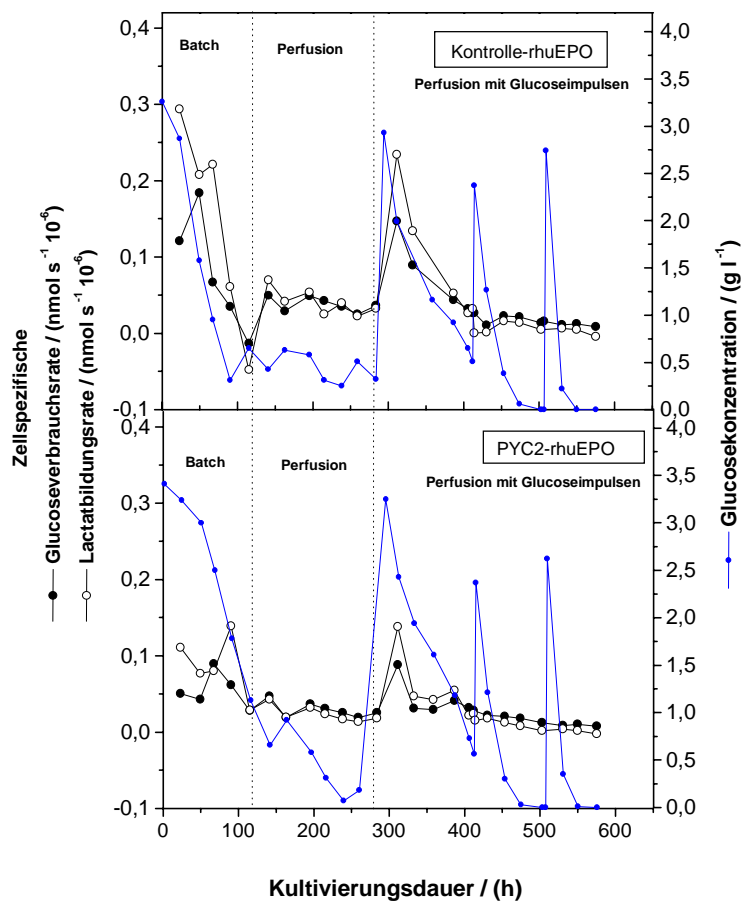
Verlauf der rhuEPO-Konzentration in den PYC2-sowie Kontrolle-rhuEPO Perfusionskulturen. Die Perfusion wurde in beide Fermenter über die gesamte Kultivierungsdauer identisch gehalten. In der Anfangsphase der Perfusion hatte die Kontrollkultur eine höhere rhuEPO-Konzentration als die PYC2-rhuEPO Kultur. Im späteren Verlauf der ersten Perfusionphase glichen sich die rhuEPO-Konzentrationen an.

rhuEPO-Konzentration in der PYC2-rhuEPO Kultur ab, die rhuEPO-Konzentration in der Kontrollkultur dagegen stieg weiter bis auf eine maximale rhuEPO-Konzentration von  $192 \text{ ng ml}^{-1}$  an. Während dieser Phase wurden in der PYC2-rhuEPO Kultur höhere Wachstumsraten erzielt als in der Kontrollkultur. Nach dem Entleeren eines Teils des Fermenters wuchsen beide Kulturen zunächst mit etwa der gleichen Wachstumsrate. Die Kontrollkultur verzeichnete während dieser Wachstumsperiode einen steilen rhuEPO-Konzentrationsanstieg und erreichte mit durchschnittlich  $271 \text{ ng ml}^{-1}$  höhere

rhuEPO-Konzentrationen als die PYC2-rhuEPO Kultur, die durchschnittlich  $203 \text{ ng ml}^{-1}$  aufwies. Gegen Ende der Fermentation kam es in der PYC2-rhuEPO Kultur zu einer steilen Abnahme der rhuEPO-Konzentration sowie einem leichtem Rückgang der Zellkonzentration, was vermutlich mit einer schlechten Sauerstoffversorgung durch die bereits stark beanspruchte Begasungsmembran zu erklären ist.

#### **3.3.8.4 Zellspezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten**

Die zellspez. Glucoseverbrauchsrate waren in der PYC2-rhuEPO Kultur sowohl während der Batch als auch der Perfusionsphase niedriger als in der Kontrollkultur (s. Abb. 3.3.8.4). Die Unterschiede in den zellspez. Glucoseverbräuchen waren am Anfang der Batchphase, wie in allen bisherigen Experimenten, mit  $0,05$  und  $0,15 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  für die PYC-rhuEPO bzw. die Kontrolle-rhuEPO Kultur am größten. Die zellspez. Lactatbildungsraten im gleichen Zeitraum lagen bei jeweils  $0,09$  und  $0,25 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  für die PYC-rhuEPO bzw. die Kontrollkultur. Im ersten Abschnitt der Perfusion lagen die zellspez. Glucoseverbrauchsrate bei  $0,03$  für die PYC2-rhuEPO und  $0,04 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  für die Kontrollkultur. Die entsprechenden Werte für die zellspez. Lactatbildungsraten waren  $0,02$  und  $0,04 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$ . Die kurzzeitige Erhöhung der Glucosekonzentration führte zu keiner merklichen Zunahme der Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsrate. Erst eine längere Periode mit erhöhten Glucosekonzentrationen führte zu einem verstärkten Glucosekonsum und verstärkter Lactatfreisetzung. Das Lactat/Glucose Verhältnis lag bei den PYC2-rhuEPO Zellen mit  $0,66$  unterhalb von eins, das für die Kontrollzellen erzielt wurde.

**Abb. 3.3.8.4**

Verlauf der zellspezifischen Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsrate für die PYC2-rhuEPO sowie die Kontrolle-rhuEPO Kultur.

### 3.3.9 Wachstum und Produktion unter glutaminlimitierten Bedingungen

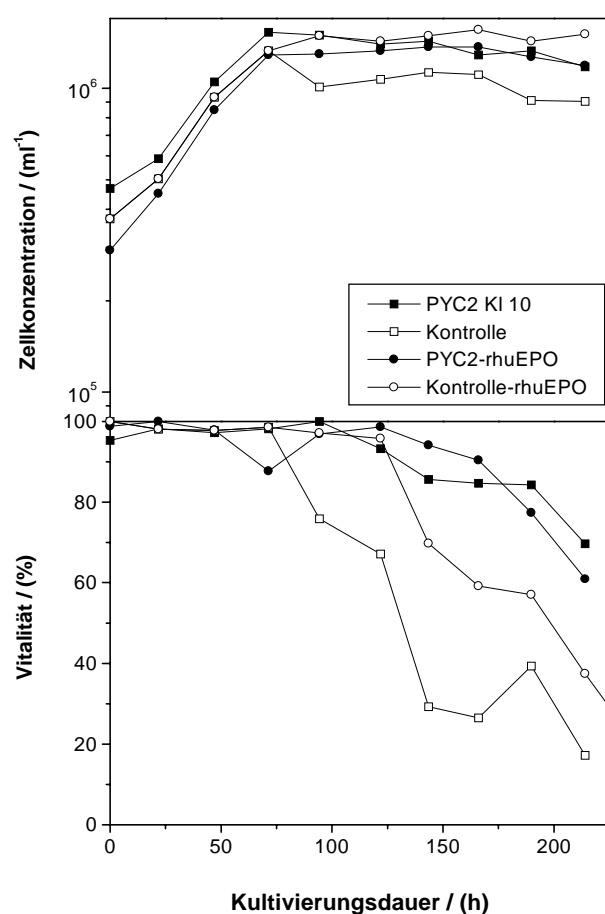
Mit der Feststellung, daß die Substratverbrauchsraten in den mit der Hefe-Pyruvat-Carboxylase transfizierten Zellen geringer ist, sollte untersucht werden, ob die Menge der Nahrungsquelle Glutamin im Kultivierungsmedium herabgesetzt werden kann, ohne das Wachstum und die Produktivität zu beeinträchtigen. Eine geringe Glutaminkonzentration soll die Ammoniumfreisetzung und die damit einhergehende Veränderung der Produktqualität begrenzen. Für diese Kultivierung wurde ein Zulaufverfahren (fed-batch) gewählt, bei der täglich Glucose bis zu einer Endkonzentration von 20 mmol l<sup>-1</sup> zu den Kulturen nachgefüttert wurde, so daß für eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Energie gesorgt war. Zur Untersuchung des Zellwachstums und des Produktionsverhaltens der Zellen wurden sowohl die mit



dem bicistronischem EGFP-EPO Plasmid transfizierten Zellen als auch die eingangs verwendeten Zellen BHK-21 PYC2 Klon 10 und die dazugehörige Kontrolle, BHK-21 A Kontrolle, eingesetzt. Die Zellen wurden in einem Dreikomponenten Medium kultiviert, dem Glutamin in einer Ausgangskonzentration von  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  zugegeben wurde.

### 3.3.9.1 Wachstum und Vitalität

Alle vier Kulturen wuchsen mit ähnlichen Wachstumsraten und erreichten Zellkonzentrationen zwischen  $1,3 \times 10^6$  und  $1,5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  (s. Abb. 3.3.9.1). Der Verlauf der Zellvitalität über die Kultivierung bestätigte die bisherigen Ergebnisse der Batchkultivierungen. In beiden Kontrollkulturen nahm die Konzentration der vitalen



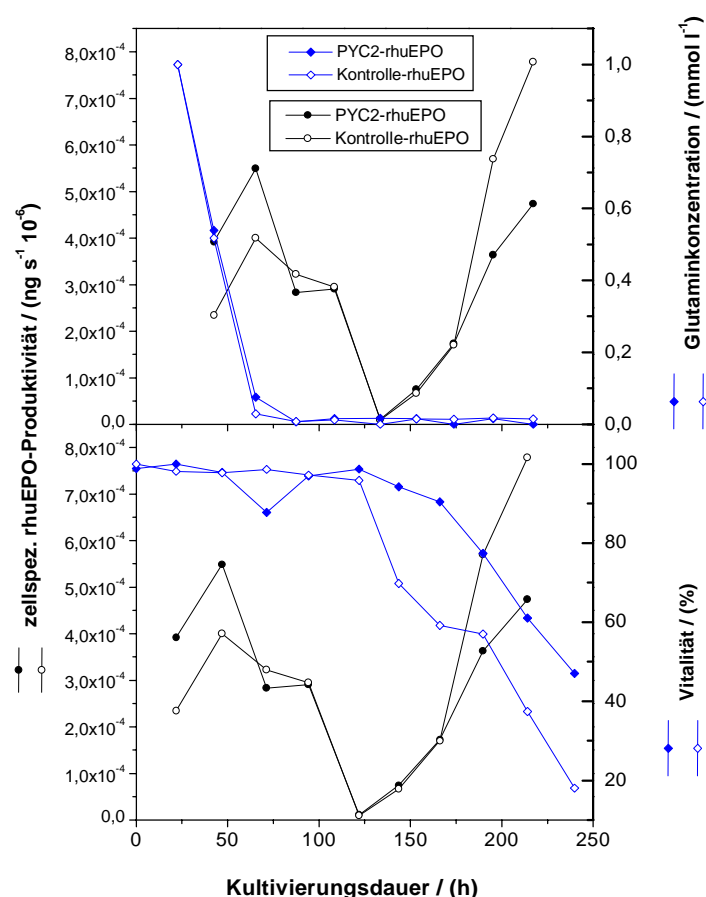
**Abb. 3.3.9.1**

Verlauf der Zellkonzentrationen (oben) und der Zellvitalität (unten) in einer glutaminlimitierten fed-batch Kultivierung mit BHK-21 PYC2 Klon 10 und PYC2-rhuEPO Zellen sowie den jeweils dazugehörigen Kontrollkulturen. Die PYC2 exprimierenden Kulturen wiesen im Vergleich zu den Kontrollkulturen eine längere Phase hoher Zellvitalität auf. Die Kontrollzellen traten bereits nach 3-5 Tagen in die Sterbephase ein, die PYC2 exprimierenden Kulturen dagegen erst nach 4-6 Tagen.

Zellen nach 3-5 Tagen bereits deutlich ab, während die PYC2 exprimierenden Kulturen eine längere Vitalitätsphase hatten. Die Vitalität beider Kontrollkulturen war bereits nach 100 bis 150 h unterhalb von 80 % gesunken. Bei den PYC2 exprimierenden Kulturen war dies erst nach ungefähr 200 h erreicht.

### 3.3.9.2 Zellspezifische rhuEPO-Produktivität und die Glutaminkonzentration im Überstand

Die zellspezifische rhuEPO-Produktivität (s. Abb. 3.3.9.2) war zur Anfang der Kultivierung in der PYC2 exprimierenden Kultur mit  $4 \times 10^{-4} \text{ ng s}^{-1} 10^6$  etwa doppelt so hoch wie in der Kontrolle. Nach etwa 50 h Kulturdauer glichen sich die Produktivitäten in beiden Kulturen an und fielen kontinuierlich bis 125 h auf den Wert null ab. Die Glutaminkonzentration im Medium war nach etwa 50 h völlig erschöpft und im Anschluß daran setzte die Abnahme der Produktivität ein. Die rhuEPO-Produktion bei



**Abb. 3.3.9.2**

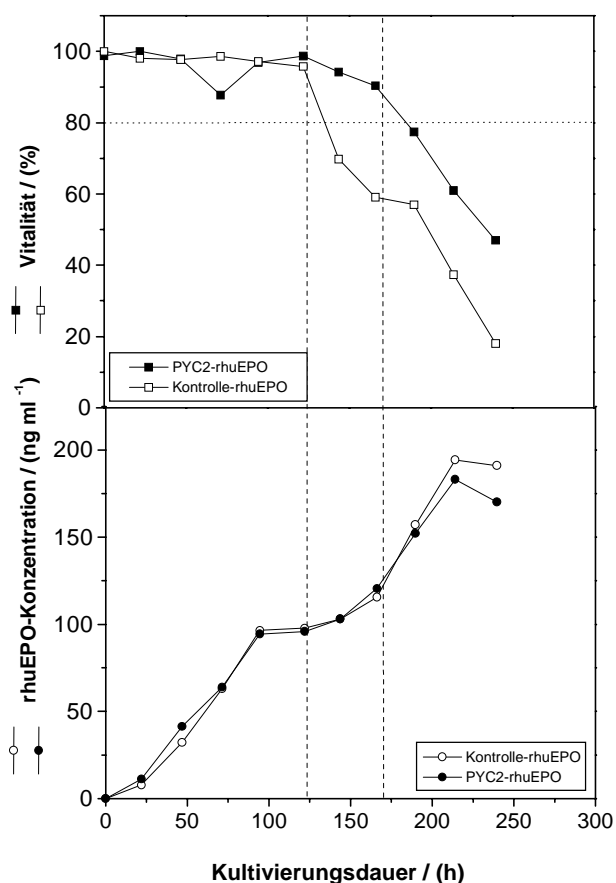
Verlauf der zellspezifischen rhuEPO-Produktivität, der Zellvitalität sowie der Glutaminkonzentration im Kulturüberstand für die glutaminlimitierten fed-batch Kulturen. Das Glutamin aus dem Medium war nach ca. 50 h in beiden Kulturen vollständig verzehrt (oben). Zur Anfang der Kultivierung war die zellspez. rhuEPO-Produktivität in der PYC2-rhuEPO Kultur höher als in der Kontrolle-rhuEPO Kultur. Im weiteren Verlauf der Kultivierung glichen sich die Produktivitäten an. Nach 100 h nahm die rhuEPO-Produktivität in beiden Kulturen wieder zu. Dieser Prozeß ging mit einer Abnahme der Zellvitalität (unten) einher.

vollständigem Fehlen von Glutamin wie zwischen den Kultivierungsstunden 50 und 125 zu beobachten war, ist vermutlich auf den Verzehr von intrazellulär gespeicherte Glutaminreserven zurückzuführen. Unter glutaminlimitierten Verhältnissen hatte die PYC2-rhuEPO Kultur eine höhere zellspezifische Produktivität als die Kontrolle-rhuEPO Kultur. Die Zunahme der rhuEPO-Produktivität nach 125 h ist möglicherweise auf das Freiwerden von intrazellulärem, unvollständig prozessiertem rhuEPO aus lysierenden Zellen zurückzuführen. Diese Vermutung wird unterstützt von der Tatsache, daß das erneute Ansteigen der rhuEPO-Produktivität nachdem es einen Minimum erreicht hatte, mit dem Anfang einer Abnahme der Zellvitalität zusammenfällt (s. Abb. 3.3.9.2).

Die rhuEPO-Ausbeute pro verbrauchter Glucose war in den ersten 50 h bei der PYC2-rhuEPO Kultur mit 0,003 und 0,01 ng nmol<sup>-1</sup> etwa 2 bis 3 fach höher als in der Kontrolle-rhuEPO Kultur. Später drehte sich das Verhältnis zugunsten der Kontrolle-rhuEPO Kultur um (keine Abbildung).

### 3.3.9.3 Ein Vergleich der Gesamtproduktausbeuten

Im Folgenden wurde ein Vergleich der Produktion zwischen den PYC2-rhuEPO und den Kontrolle-rhuEPO Zellen vorgenommen. Unter der Annahme, daß ein industrieller Produktionsprozeß abgebrochen wird, sobald eine Zellvitalität von 80 % unterschritten wird, wurde die erzielte Produktkonzentration zu dem entsprechenden Zeitpunkt ermittelt und daraus auf die Gesamtausbeute geschlossen. Die Frage nach der Vitalität der Kultur ist wichtig, da sie über die Produktqualität entscheidet. Mit abnehmender Zellvitalität einer Kultur treten vermehrt proteolytisch gespaltene bzw. unvollständig prozessierte Produkte auf, die so zu einer Verringerung der Produktausbeute beitragen. Wird eine Kultur in der stationären Phase des Zellwachstums über eine vergleichsweise verlängerte Periode vital gehalten, kann die Produktausbeute pro Zeiteinheit gegenüber einer Kultivierung, die nach wenigen Tagen abgebrochen und erneut nach der Inokulation gestartet werden muß, erhöht werden, vorausgesetzt die Produktion des erwünschten Proteins ist nicht wachstumsgekoppelt.

**Abb. 3.3.9.3**

Verlauf der Zellvitalität (oben) und rhuEPO-Konzentration (unten) im glutaminlimitierten fed-batch Kultivierung. Die Zellvitalität in der PYC2-rhuEPO Kultur bleibt länger erhalten als in der Kontrolle-rhuEPO Kultur. In einem Produktionsprozeß würde die Kultivierung bei Erreichen von 80 % Vitalität abgebrochen und der Kulturüberstand abgeerntet werden. Dabei würde die PYC2-rhuEPO Kultur nach 187 h (8 d) eine rhuEPO-Konzentration von 140 ng ml<sup>-1</sup>, die Kontrollkultur nach 136 h (6 d) eine rhuEPO-Konzentration von nur 100 ng ml<sup>-1</sup> erreichen.

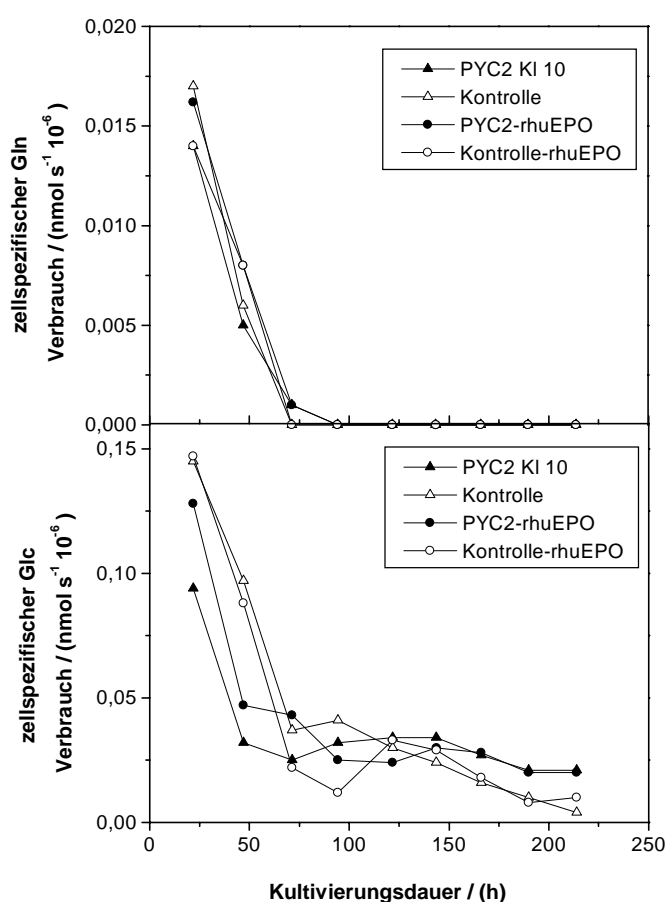
Hiermit könnten Arbeitsaufwand sowie Kosten, die für die Reinigung, Sterilisation und Befüllung der Fermenter bei der industriellen Produktion von Proteinen benötigt werden, eingespart werden.

Für die vorliegende fed-batch Kultivierung mit limitiertem Glutamingehalt im Medium (s. Abb. 3.3.9.3) wurde für die Kontrollzellen eine Vitalität von 80 % bereits nach etwa 6 Tagen erzielt, während die PYC2-rhuEPO Zellen diese erst nach 8 Tagen zeigten. In dieser Kultivierungsperiode konnte in der PYC2-rhuEPO Kultur eine rhuEPO-Konzentration von 140 ng ml<sup>-1</sup> erreicht werden, in der Kontrolle dagegen lediglich 100 ng ml<sup>-1</sup>.

### 3.3.9.4 Zellspezifische Substratverbrauchsraten

Die zellspezifischen Verbrauchsraten für Glutamin waren sowohl in den rhuEPO

exprimierenden als auch in den beiden anderen Kulturen mit Werten zwischen  $0,014$  und  $0,017 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  sehr ähnlich (s. Abb. 3.3.9.4). Bei den vergleichsweise niedrigen Glutamin-Ausgangskonzentrationen waren keine Unterschiede in den Verbrauchsrate zwischen den PYC2 exprimierenden Zellen und den Kontrollzellen zu erkennen.



**Abb. 3.3.9.4**

Verlauf der zellspezifischen Glutamin- und Glucoseverbrauchsrate im glutaminlimitierten fed-batch Versuch. Glutamin, das in einer sehr geringen Konzentration im Medium vorgelegt wurde, zeigte in allen Kulturen eine geringe und nahezu identische Verbrauchsrate. Die Glucoseverbrauchsrate dagegen waren in den Kontrollkulturen höher als in den PYC2 exprimierenden Kulturen.

Das Glutamin im Medium war bereits nach 2-3 Tagen völlig erschöpft. Der Glucoseverbrauch war in den PYC2 exprimierenden Zellen mit  $0,094$  (BHK-21 PYC2 KI 10) und  $0,13 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$  (PYC2-rhuEPO) niedriger als für beide Kontrollkulturen mit  $0,15 \text{ nmol s}^{-1} 10^{-6}$ .

---

### **Zusammenfassung von 3.3:**

- 1) Die Transfektion der rekombinanten PYC2 exprimierenden Zelllinie sowie der Kontrolle mit dem bicistronischen EGFP-rhuEPO Plasmid führte zu einer erfolgreichen Expression von rhuEPO in beiden Zelllinien. Die EGFP bzw. rhuEPO-Expression blieb über die gesamte Kultivierungsdauer in einem Bioreaktor (ca. 3 Wochen) ohne Selektionsdruck stabil.
- 2) Das exprimierte rhuEPO wurde als vollständige Proteinkette in den Zellen produziert und sie war vollständig N- und O-glycosyliert.
- 3) Die rhuEPO exprimierenden Zellen zeigten folgende metabolische Charakteristika und Produktionsverhalten unter satzweisem und kontinuierlichen Kultivierungsbetrieb:
  - Das Wachstum der PYC2 und rhuEPO exprimierenden Zellen war in Batchbetrieb unbeeinflusst. Wie für die PYC2 exprimierenden Zellen konnte auch bei den PYC2-rhuEPO Zellen die Vitalität über einen vergleichsweise längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden.
  - Die PYC2-rhuEPO Kulturen erreichten im kontinuierlich perfundierten Bioreaktor bei identischen Perfusionsraten, also bei gleichem Zeit- und Medienaufwand, bis zu 1,5 fach höhere Zellkonzentrationen.
  - Die Glucoseverbrauchs- sowie Lactatbildungsraten waren sowohl in satzweise betriebenen als auch in kontinuierlich perfundierten Kulturen reduziert. Das Lactat zu Glucose Verhältnis war ebenfalls reduziert.
  - Die zellspezifischen rhuEPO-Produktivitäten lagen in den Batch- und Chemostatkulturen gegenüber der Kontrolle etwas niedriger. In kontinuierlich perfundierten Kulturen verhielten sich die Produktivitäten unterschiedlich. Dies scheint von einigen Faktoren abhängig zu sein:

- Es konnte gezeigt werden, daß in kontinuierlich perfundierten Kulturen die rhuEPO-Produktion von der Glucosekonzentration im Medium abhängt. Dieses Phänomen war bei der Kontrollkultur wesentlich stärker ausgeprägt als bei der PYC2 exprimierenden Kultur.
- Ein inverser Zusammenhang zwischen der rhuEPO-Produktion und der Wachstumsrate lag in kontinuierlich perfundierten Reaktoren für die PYC2 exprimierende Kultur vor.
- Die rhuEPO-Ausbeute von PYC2 exprimierenden Zellen konnte in kontinuierlich perfundierten Bioreaktoren gegenüber einer Vergleichskultur
  - bis zum zweifachen gesteigert werden, wenn die Wachstumsrate mit derjenigen der Vergleichskultur übereinstimmte.
  - verbessert werden, wenn die Glucosekonzentration im Medium limitierend war.
- Im fed-batch Reaktor unter glutaminlimitierten Bedingungen, die bei Produktionsprozessen besonders vorteilhaft sind, können durch eine Verlängerung der Kultivierungsperiode höhere Produktausbeuten erzielt werden.
- Lediglich in Batch- und Chemostatkulturen war die Gesamtausbeute von rhuEPO für die PYC2 exprimierenden Kulturen schlechter.

Die Verwendung der PYC exprimierenden Zellen kann unter Substratlimitierung und Perfusionsbedingungen zu höheren Produktausbeuten pro Zeit- und Medieneinheit führen und die Raum-Zeit-Ausbeute einer Kultivierung verbessern. Folglich können Produktionskosten gesenkt werden.

## 4 Diskussion

Kontinuierliche Säugerzelllinien zeichnen sich durch einen Primärenergiemetabolismus aus, bei der die konsumierte Glucose nur unvollständig oxidiert wird. Dadurch kommt es zu einem übermäßig hohen Bedarf an Energiequellen sowie der Produktion von toxisch wirkenden Nebenprodukten wie Lactat und Ammonium. Durch die Einführung einer cytosolischen Pyruvat-Carboxylase in eine BHK-Zelllinie und damit der Wiederherstellung einer enzymatischen Verbindung zwischen der Glycolyse und dem Citratcyclus sollte der Primärstoffwechsel derart verändert werden, daß es zu einer effizienteren Nutzung von Substraten kommt. Das Ziel der Arbeit war, mit dieser Technologie metabolisch veränderte Zelllinien zu schaffen, die sich in der industriellen Produktion als weniger problematisch und besonders als kostengünstige Produktionsvehikel erweisen würden. Obwohl die Fehlfunktionen von entarteten Zellen seit einiger Zeit bekannt sind (Fiechter und Gmünder, 1989, Fitzpatrick et al., 1993, Petch et al., 1994, Neermann und Wagner, 1996, Vriezen et al., 1998), wurden bislang keine Anstrengungen unternommen, diese Defekte durch gezielte Eingriffe zu reparieren oder zu umgehen. Aufgrund der hohen Komplexität des Metabolismus und seiner ausgeprägten Regulierung wird angenommen, daß der Primärmetabolismus schwer zu manipulieren sei. Die Veränderung von Stoffwechselwegen kann zu einer Akkumulation von bestimmten Intermediaten des Stoffwechsels führen, die wiederum Stoffflüsse in andere Stoffwechselwege dirigieren könnten bzw. die Aktivität bestimmter Enzyme durch Aktivierung oder Inhibierung verändern könnten (Stephanopoulos und Vallino, 1991). Somit würde ein einziger Eingriff eine Kette von Veränderungen nach sich ziehen, die das Gleichgewicht des Zellmetabolismus völlig stören und im schlimmsten Fall gar den Zelltod bewirken könnte. Im Hinblick auf diese Annahmen wurde zunächst ein vorsichtiger Schritt zur Manipulation des Primärstoffwechsels von Neermann (1996) unternommen. Das Eingangsenzym der Glycolyse, die Hexokinase, konnte Neermann als den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glycolyse identifizieren und durch die Klonierung des Gens für die Hexokinase I in eine BHK-Zelllinie die Gendosis und damit die Aktivität dieses Enzyms in der Zelle erhöhen. Es kam hierbei zu einer Steigerung des glycolytischen Fluxes



und einer Erhöhung der Lactatproduktionsrate sowie einer nahezu Verdreifachung des zellulären ATP Gehaltes. Mit der Erhöhung des ATP Levels der Zelle ging eine Erhöhung der Produktivität einher. Gleichzeitig wurde die Wachstumsrate als Folge eines erhöhten glycolytischen Fluxes erniedrigt, was mit einem verminderten Fluß von Glucose in den Pentosephosphatweg (Reitzer et al., 1979, Zielke et al., 1978) und einer Erhöhung des wachstumsinhibierenden UDPGNac Gehaltes (Neermann, 1996) zu erklären ist. Dieser Versuch demonstrierte, daß ein direkter Eingriff in den Primärstoffwechsel durchaus möglich ist, ohne dabei den Zelltod herbeizuführen.

Weitergehende Schritte bei der Veränderung des Primärstoffwechsels sollten die negativen Auswirkungen eines erhöhten glycolytischen Fluxes verhindern, jedoch die Glucosenutzung und Energiegewinnung effizienter gestalten. Dazu mußten die in der Zelle bereits vorliegenden Stoffwechselwege umgangen, und statt dessen neue Seitenwege für die Lenkung von Metabolitenflüsse geschaffen werden. Die Verstärkung eines bereits bestehenden Stoffwechselweges durch die Erhöhung der Gendosis ist vermutlich weniger erfolgreich, da sie die Stoffflüsse lediglich um den gleichen Faktor wie die der Enzymaktivitätserhöhung verbessert. Hinzu kommt, daß das Enzym, dessen Dosis erhöht wurde, ebenfalls von intrazellulären Aktivitätsregulierungen und anderen Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen betroffen ist wie das native Enzym. Die Einführung eines im Primärstoffwechsel zentralen Enzyms, der Hefe-Pyruvat-Carboxylase, stellt einen neuen Weg zur Verbesserung des Energiestoffwechsels dar. Aufgrund der komplexen Vernetzung der Pyruvat-Carboxylase mit anderen Stoffwechselwegen sowie seiner Involvierung bei gluconeogenetischen als auch katabolischen, Glucose abbauenden Funktionen war die Aussicht auf Erfolg bei diesem *Metabolic Engineering*-Versuch wenig vorhersagbar.

## 4.1 Expression der Pyruvat-Carboxylase

Die Expression der Hefe-Pyruvat-Carboxylase in BHK-21 Zellen gehört zu einem der wenigen Versuche, ein Gen aus der *Saccharomyces cerevisiae* in einer

Mammaliazelle zu exprimieren. Häufig wird der umgekehrte Weg beschritten und ein Mammaliagen in niedrigere Organismen wie Hefen oder Bakterien zur Expression gebracht. Zu einer der wenigen Beispiele wo ein Hefegen in einer tierischen Zelle exprimiert wurde, gehört die Arbeit von Ganguly et al. (1988), die einen amber Suppressor tRNA<sup>Leu</sup> Gen (SUP53) in CV1-Zellen klonierten.

Bei der Klonierung des Gens für die Pyruvat-Carboxylase in BHK-Zellen war es wichtig, die flankierenden hefespezifischen Sequenzen am 5' und 3' Ende des Gens zu entfernen. Häufig führen spezienfremde Sequenzen stromaufwärts und -abwärts des eingeführten Gens zu einer Störung der Transkription oder Translation im Zielorganismus. So ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß in einer dem Gen vorgeschalteten Sequenz ein AUG Startsignal vorkommt, der eine frühzeitige Translation einleiten würde. Somit würde das erwünschte Startsignal nicht mehr erkannt werden, und es käme zu einem falschen Translationsprodukt (Van den Heuvel, 1990). Stromabwärts geschaltete Sequenzen hingegen könnten als regulatorische Elemente erkannt werden, die zu einer frühzeitigen Beendigung der Transkription führen und die ordnungsgemäße Polyadenylierung der mRNA verhindern könnten. Damit wäre die mRNA Stabilität nicht mehr gewährleistet.

Um die Expression der Pyruvat-Carboxylase sicherzustellen, wurde die Genexpression von der Transkription über die Proteintranslation bis hin zur Enzymaktivitätsbestimmung verfolgt.

### **PYC2 Genexpression**

Durch Northern Blot Analysen konnte die Genexpression der eingeführten Hefe-Pyruvat-Carboxylase gezeigt werden. Die einzelnen Klone zeigten Banden unterschiedlicher Stärke sowie Transkripte unterschiedlicher Längen. Eine Expression war für alle untersuchten Klone sichtbar, insbesondere für Klon 10, der für die weiteren Untersuchungen als repräsentativer Klon ausgewählt wurde. Die Möglichkeiten zur Verbesserung der Expression werden im übernächsten Unterpunkt bearbeitet.

Die Expressionsstärke jedes Klons ist unterschiedlich und hängt in erster Linie von der Stabilität der Transfektion ab sowie der chromosomalen Umgebung des insertierten Gens (Devaux et al., 1985, Poljak et al., 1994). Ist der Insertionslocus transkriptionell hoch aktiv, kommt es zu einer starken Expression des erwünschten Gens.

Unterschiedliche Transkriptlängen dagegen können in einem total RNA-Blot sichtbar werden, weil sich das Plasmid an unterschiedlichen Stellen öffnen kann, um sich in das Genom zu integrieren. Dabei kann das unlinearisierte Plasmid so inseriert werden, daß die Terminationsstelle, die normalerweise nach dem Gen lokalisiert ist, vor dem Promoter zu liegen kommt. Bei der Transcription des eingeführten Plasmidfragments wird somit über das Stop Signal hinaus transkribiert bis eine endogene Terminationsstelle innerhalb des Wirtschromosoms gefunden wird. So entstehen sogenannte "run-through" Transkripte, die wesentlich länger sein können als das eigentliche Gen.

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, daß es zu Schwierigkeiten bei der posttranskriptionalen Prozessierung kommt. So zeigten Versuche von Ganguly et al. (1988) sowie Goff und Berg (1979), daß Transkripte eines *Saccharomyces cerevisiae* tRNA-Gens in Mammaliazellen *in vivo* nicht vollständig am 5' und 3' Ende prozessiert und gespleißt wurden. Die Expression des Gens in Gegenwart von zellfreien HeLa oder CV1-Extrakten *in vitro* dagegen führte zu vollständig prozessierten und gespleißten Transkripten (Ganguly et al. 1988). Daraus schlossen die Autoren, daß es möglicherweise Probleme beim Transport zu oder der Assoziierung an den richtigen Subkompartimenten des Nucleus gibt, wo die Transkription und Prozessierung der pre-RNAs voneinander getrennt lokalisiert ablaufen.

Weiterhin ist bekannt, daß ribosomale RNA die Sondenhybridisierung sowie den Lauf von Banden beeinflussen kann. Dies könnte für die erwarteten Transkripte von 3,5 bis 3,7 kb der Fall gewesen sein, die genau zwischen der 18S (2 kb) und 28S (5kb) rRNA zu liegen kommen würden (Manfred Wirth, persönliche Kommunikation).

### **PYC2 Proteinexpression und Enzymaktivität**

Die Expression der Pyruvat-Carboxylase konnte mit Hilfe von Immunoblots für alle untersuchten BHK-21 PYC2 Klone nachgewiesen werden. Die Unterschiede der Expressionsstärke machten sich in der Bandenbreite und -schwärzung bemerkbar. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß sowohl die untransfizierten Wildtypzellen als auch die mit der Neomycinresistenz transfizierten Kontrollzellen eine schwache Pyruvat-Carboxylase Expression aufwiesen. Diese schwache Expression, die bisher in der Literatur (Fitzpatrick et al., 1993, Petch und Butler, 1994, Neermann and Wagner,

1996, Vriezen, 1998) nicht nachgewiesen werden konnte, muß auf die native, mitochondriale PC zurückzuführen sein. Die BHK-21 PYC2 Klone wiesen zumeist eine stärkere Bandenintensität auf, was auf die zusätzliche Expression der cytosolischen Hefe-Pyruvat-Carboxylase schließen läßt. Der repräsentative PYC2 Klon hatte dabei, wie aus der densitometrischen Bandenintensitätsbestimmung hervorgeht, ungefähr die doppelte Expressionsrate wie die Kontrolle. Messungen mit dem Radioisotopen-Enzymtestverfahren zeigten ebenfalls, daß eine Pyruvat-Carboxylase Grundaktivität in den Kontrollzellen vorlag. Der BHK-21 PYC2 Klon hatte dabei aufgrund der zusätzlichen PYC2 Aktivität eine 1,7 fach höhere Pyruvat-Carboxylase Aktivität als die Kontrolle. Das Verhältnis der Enzymaktivitäten steht in gutem Einklang mit dem Verhältnis der durch die Western Blots bestimmten Expressionshöhe.

Für eine spezifische Bestimmung der Hefe-Pyruvat-Carboxylase Aktivität ist es sinnvoll, das Enzym zunächst aufzureinigen und zu charakterisieren. Um ausreichende Enzymmengen für die Untersuchung zu erhalten, würden jedoch Zellmassen, die 100-400 g Leber entsprechen, benötigt (Scrutton et al., 1969).

### **Einschätzung und Verbesserung der Expressionshöhe**

Die Expressionshöhe der PYC2 ist, wie aus den Enzymtests und den Western Blots zu entnehmen war, relativ gering. Worin könnte das begründet sein?

Zunächst sollte erwähnt werden, daß bei jedem Transfektionsvorgang der Prozeß der Klonierung und Subklonierung eine große Rolle für die Auswahl der richtigen Klone mit hoher Expressionsrate des eingeführten Gens spielt. Die Wahrscheinlichkeit einen Klon mit hoher Expression zu erhalten, steigt mit der Anzahl gepickter und untersuchter Klone. Um einen Klon mit hoher Expressionsrate zu erhalten, müßten mehrere hundert Klone gescreent werden, was mit einer wochen- bis monatelangen Arbeit verbunden ist (Wirth in: Hauser und Wagner, 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nur etwa 10 zufällig ausgewählte Klone näher untersucht, daher kann davon ausgegangen werden, daß die gemessenen Expressionsraten einem durchschnittlichen Wert entsprachen.

Darüber hinaus gibt es weitere Aspekte, die bei jeder Transfektion unterschiedlich sein können. So ist die Expression eines aus einer fremden Spezies stammenden Gens in einer Mammaliazelle mit vielen unbekannten Faktoren behaftet. Es ist unklar, ob die

Hefe bevorzugt bestimmte Basen oder Basensequenzen verwendet, die in einer fremden Spezies eine regulatorische Funktion haben und sich inhibierend bzw. aktivierend auf die Expression auswirken können. Treten solche Sequenzen innerhalb des Gens auf, könnte es zu einer Beeinträchtigung der Transkription oder Translation kommen. Eine weitere wahrscheinliche Erklärung für die schwache PYC2-Expression ist eine unvollständige Prozessierung der Transkripte. Dadurch könnte es zu einer unzulänglichen Translation bzw. einer Instabilität der mRNA Produkte kommen (Hauser in: Hauser und Wagner, 1997). Es ist möglich, daß die Wahl anderer Polyadenylierungssignale oder das Entfernen des im Vektor vorhandenen Spleißsignals vor dem Gen dieses Problem unterbindet (vgl. Abb. 2.8.1.2b).

Aufgrund der Verwendung von bestimmten Codonen, die in Mammaliazellen seltener anzutreffen sind, besteht weiterhin die Möglichkeit, daß die Translation des Hefegentranskripts weniger effektiv abläuft (John C. Wallace, persönliche Kommunikation). So werden tatsächlich alle Gene von *Saccharomyces cerevisiae* mit nur 46 statt der maximal möglichen 61 Codonen, wie dies bei Mammaliazellen der Fall ist, übersetzt (Watson et al., 1988). Die geringe Verfügbarkeit entsprechender tRNAs in der Mammaliazelle könnte zu einer Verzögerung der Elongation führen (Stryer, 1990). Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, bestünde darin, die Basenzusammensetzung des PYC2 Gens mit der des mitochondrialen Mammaliaenzym zu vergleichen. Die Sequenzanalyse könnte Aufschluß über kritische Stellen geben, die mit Hilfe von Mutagenese oder PCR-Techniken durch andere Codonen ersetzt werden könnten.

Weiterhin könnte die Effektivität der verwendeten Vektoren ein Grund für unzureichende Genexpression sein. Zur genauen Untersuchung könnte die Transkription und Translation des verwendeten Plasmids unter *in vitro* Bedingungen in zellfreien BHK-21 Extrakten getestet werden. Ist die Translationsrate gering, könnte man das Plasmidkonstrukt durch die Wahl anderer genetischer Elemente wie Promotoren und Enhancer oder durch die Einführung von SAR Elementen (Poljak et al., 1994, Klehr et al., 1991, Bode et al., 1995) optimieren. Es kann jedoch angenommen werden, daß dieses System bereits gut optimiert ist, da die verwendeten Elemente zuvor für viele andere Expressionsversuche erfolgreich eingesetzt wurden (Manfred Wirth, persönliche Kommunikation).

Für die Verbesserung der Expression stehen noch andere Mittel zur Verfügung. So ist bekannt, daß der Zusatz von Butyrat (Kooistra et al., 1987, Olsen et al., 1995, Dorner et al., 1989) sowie Trichostatin A (Condreay et al., 1999) die Expressionsrate vieler Gene in Abhängigkeit von der eingesetzten Substanzkonzentration erhöht. Dieser Effekt beruht auf einer Änderung des Hyperacetylierungsgrades von Chromatin (Lee et al., 1993). Durch den Einsatz dieser Chemikalien könnte man den Einfluß der PYC2 auf den Primärstoffwechsel untersuchen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, die Expression des PYC2-Gens durch die Verwendung eines konstitutiven Promoters ein- und auszuschalten. Mit Hilfe eines Dexamethason induzierbaren Promoters konnte das Biotechnology Research Institute in Montreal in einer Kooperationsarbeit mit der GBF die konstitutive Expression der PYC2 erfolgreich zeigen und die Expression des PYC2 in Abhängigkeit von der Butyratkonzentration steigern.

Eine weitere elegante und zugleich industriell weitaus interessantere Variante zur Erhöhung der Genexpression ist die Einführung der PYC2 in dhfr-defizienten CHO Zelllinien wie z.B. der CHO DUKX B11 (Urlaub und Chasin, 1980) und der anschließenden Amplifikation der Genkopienzahl mit Methotrexat (Wurm et al., 1986).

### **Pyruvat-Carboxylase Expression in Primärzellen und kontinuierlichen Zelllinien**

Der Vergleich von Pyruvat-Carboxylase Expression in verschiedenen Zelltypen zeigt, daß die PC-Expression in PYC2 transfizierten und Wildtyp BHK-21 Zelllinien deutlich geringer ausfällt als in primären Leber- und Nierenzellen sowie Insektenzellen (s. Abb. 3.2.5b). Somit zeigt sich, daß die geringe Pyruvat-Carboxylase Aktivität in entarteten Zellen vermutlich auf eine zu geringe Expressionsrate des Enzyms zurückzuführen ist.

## **4.2 Reproduzierbarkeit der Versuche**

Um die erzielten stoffwechselspezifischen Ergebnisse dieser Arbeit abzusichern und den Einfluß des Zufalls oder klonspezifischer Eigenschaften auszuschließen, wurden in mehrmals wiederholten Batchversuchen verschiedene Klone auf ihr Wachstum und ihre Substratverbrauchsraten hin untersucht. Die beobachteten Ergebnisse konnten

bei allen Experimenten von neuem reproduziert werden. Aus diesem Grund konnten dann einige Versuche zur Charakterisierung der PYC2 transfizierten Zellen mit einem einzigen repräsentativen Klon durchgeführt werden. Es war weiterhin wichtig zu demonstrieren, daß die Ergebnisse unabhängig von der Verwendung einzelner Klone oder einer Klonmischkultur waren. Dazu wurden die Versuche zur Charakterisierung des Stoffwechsels mit verschiedenen PYC2 exprimierenden Klonen sowie Klonen aus der Kontrollkultur wiederholt. Alle Kontrollklone wiesen dabei schlechtere stoffwechselspezifische Raten auf als die PYC2 exprimierenden Klone. Daraus wurde geschlossen, daß eine Klonmischung die Kontrolle gut repräsentieren konnte. Die Reproduzierbarkeit der wichtigsten Ergebnisse war auch unter verschiedenen Kulturführungsmodi wie kontinuierlicher Chemostat- und Perfusionskultivierung gewährleistet.

### **4.3           Wachstumsverhalten**

Die Einführung des PYC2 Gens in die Zellen hatte keinen negativen Einfluß auf das Wachstumsverhalten der Zellen. Bei ähnlichen Wachstumsraten erreichten die PYC2 exprimierenden Kulturen in satzweise Betrieb die gleichen Zellkonzentrationen wie die Kontrolle. Jedoch waren die PYC2 transfizierten Zellen in der Lage, im vorgegebenem Medium für einen verlängerten Zeitraum - in Batchkulturen waren dies 2-3 Tage - zu überleben. Dies war auf einer Verlängerung der stationären Phase der Kultivierung zurückzuführen. Durch den verringerten Verbrauch an Substratquellen stellte sich im Kulturmedium, besonders gegen Ende der Kultivierung, eine höhere Glucose- und Glutaminkonzentration ein als in den Kontrollkulturen. Dadurch konnten die PYC2 exprimierenden Zellen noch Energie bereitstellen, während die Kontrollkultur bereits ihre Energiereserven ausgeschöpft hatte. Die Wachstumsrate der Kulturen konnte jedoch durch einen verringerten Substratverbrauch nicht beeinträchtigt werden. Ähnliche Beobachtungen wurden für Hybridomzellen gemacht, bei denen oberhalb einer bestimmten Substratkonzentration das Wachstum und die maximal erreichbaren Zellkonzentrationen nicht weiter gesteigert werden, jedoch die stationäre Phase

verlängert werden konnte (Miller et al., 1988b). Das könnte damit zusammenhängen, daß die Aktivität der zur Erzeugung von Zellbausteinen benötigten Enzyme während der Wachstumsphase bei beiden Kulturen bereits maximal war und das Wachstum durch andere den Zellcyclus regulierende Proteine und Faktoren wie z.B. dem Cyclin E (Renner et al., 1995) oder aus dem Medium stammenden essentiellen Substanzen wie Aminosäuren oder Vitamine begrenzt wurde. Ein verlängerter Wachstumszyklus, der mit einer verlängerten Produktionsphase einhergeht, kann zu höheren Produktausbeuten und -konzentrationen führen (Luan et al., 1987, Renard et al., 1988, Savinell et al., 1989). Dadurch wird die Raum-Zeit-Ausbeute des Reaktors erhöht, und Zeit und Kosten für die Entleerung, Säuberung und Neubeimpfung des Reaktors werden eingespart.

Die Expression der PYC2 zeigt sich bei kontinuierlich perfundierten Kulturen besonders günstig. Hierbei konnten Zellkonzentrationen bis zu 2,4 fach der Kontrollkultur erreicht werden. Mögliche Erklärungen für dieses Phänomen werden im Abschnitt 4.7.4 im Zusammenhang mit der rhuEPO-Produktion dargelegt und diskutiert.

## **4.4 Verbesserte Substratnutzung und Energiebilanz**

### **4.4.1 Glucose- und Glutaminverbrauchsrate**

Der zellspezifische Verbrauch für die Hauptenergiequellen Glucose und Glutamin konnte sowohl in satzweiser als auch kontinuierlicher Kulturführung reduziert werden. Substratquellen wurden dadurch erst nach längerer Kulturdauer ausgeschöpft, und die Zellen blieben im vorgegebenem Medium länger vital. Die Substratverbrauchsrate wurden als indirekter Parameter zur Beurteilung der Effizienz der Substratnutzung herangezogen. Unter der Annahme, daß der Energiebedarf einer Zelllinie unter gleichen Kultivierungsbedingungen konstant ist, muß man bei der Konsumierung geringerer Substratmengen von einer höheren Energieausbeute pro Substrateinheit ausgehen. In der Tat liefert der glycolytische Abbau von 1 Mol Glucose einen Energiegewinn von 2 Mol ATP und einem Mol NADH, also von insgesamt ca. 4 Mol



ATP (Wagner in: Hauser und Wagner, 1997), während der oxidative Weg bis zu 36 Mol ATP liefern kann (Krebs, 1970, Lehninger, 1964, Stryer, 1990). Mit einer geringfügigen Erhöhung des oxidativen Substratabbaus kann somit ein großer Energiegewinn erzielt werden. Es ist wichtig anzumerken, daß ein reduzierter Glucoseverbrauch nicht durch eine Erhöhung des Glutaminverbrauchs kompensiert wurde, zumal die Nutzung beider Energiequellen eng miteinander gekoppelt ist (Reitzer et al., 1978, Zielke et al., 1980, Kuchka et al., 1981, Newsholme et al., 1986, Lanks, 1986, Glacken et al., 1988, Newland et al., 1990). Zelllinien mit besserer Substratnutzung bergen großes Nutzpotential für die industrielle Produktion. Einerseits kann die Kultivierungsdauer und die Produktionsphase in einem Batchprozeß verlängert werden. Andererseits ist es möglich, die Medienkonzentration der Energiequelle Glutamin bei gleichbleibender Wachstums- und Produktionsrate zu reduzieren, wie in Abschnitt 3.3.9 gezeigt werden konnte. Medienkosten können dadurch gesenkt und darüber hinaus die Bildung von Ammonium aus Glutamin verringert werden (Tritsch and Moore, 1962, Negrotti et al., 1989). Letzteres ist entscheidend, da die Bildung von Ammonium nicht nur toxisch auf Zellen wirkt (Ozturk et al., 1992, Hassell et al., 1991), sondern auch die Proteinglycosylierung beeinflusst (Goochee et al., 1991, Gawlitzek et al., 1998, Grammatikos et al., 1998, Valley et al., 1999). Die Ammoniumkonzentration steigt innerhalb eines satzweise betriebenen Kultivierungsprozesses ständig an. Es kommt dadurch zu der Herstellung von unterschiedlichen Glycostrukturen im Laufe eines Kultivierungsprozesses. Durch eine Reduktion der Glutaminkonzentration und damit der Ammoniumfreisetzung während der Kultivierung wird die Proteinglycosylierung und somit auch die Produktqualität homogener und der Produktionsprozeß insgesamt besser kontrollierbar.

#### **4.4.2 Lactatbildungsraten**

Es ist bekannt, daß hohe Lactatkonzentrationen im Medium das Zellwachstum, die Vitalität sowie die Produktivität der Zellen beeinflussen können (Ozturk und Palsson, 1991, Ozturk et al., 1992, Glacken et al., 1988). Die Lactatbildung der PYC2 exprimierenden Zellen war analog zu den Glucoseverbrauchsdaten in allen Experimenten geringer als bei der Kontrolle. Dadurch kam es zu einer geringeren

Lactatakkumulation im Medium und somit zu einer geringeren Ansäuerung des Kulturmediums. Als Folge muß nämlich der durch die Lactatfreisetzung verursachte pH-Shift, in der Regel bei industriellen Prozessen durch die Titration mit einer Base korrigiert werden. Bei starker Lactatbildung, wie dies bei hohen Zellkonzentrationen der Fall ist, kommt es bei der pH-Korrektur zu einem Anstieg der Medienosmolarität. Die Zellen werden einem zusätzlichem Streßfaktor ausgesetzt, der zur Zellysis führen kann (Ozturk und Palsson, 1991, Reddy et al. 1992, Omasa et al., 1992, Oh et al., 1993, Reddy und Miller, 1994, Oyaas et al., 1994, Bibila et al., 1994, Ryu und Lee, 1997, Ryu et al, 1999).

## **4.5 Erhöhung der Rate oxidativer Phosphorylierung**

### **4.5.1 Flux von Glucose und Pyruvat in den Citratcyclus**

Die Messung von Stoffwechselwegen mit Hilfe radioaktiv markierter Substrate eignet sich als gute Methode für die Verfolgung metabolischer Flüsse innerhalb einer Zelle. Der erhöhte Flux von Glucose und Pyruvat zu  $\text{CO}_2$  deutet auf einen höheren Flux von Substraten in den Citratcyclus hin, was den verringerten Glucose- sowie Glutaminbedarf in den PYC2 exprimierenden Zellen erklärt. Ein Vergleich der Fluxraten der gentechnisch veränderten Zellen sowie der Kontrollzellen mit Insektenzellen zeigt, daß letztere einen bis zu 30 fach höheren Flux aufweisen. Vor diesem Hintergrund erscheint die Verbesserung des Flux' durch die Einführung der PYC2 nur marginal. Dennoch sollte berücksichtigt werden, daß eine vollständige Oxidation von Glucose gegenüber der unvollständigen Verbrennung zu Lactat einen bis zu neunfach höheren Energiebetrag freisetzt (Stryer, 1990) und sich bereits in einer effizienteren Substratausnutzung bemerkbar macht. Eine mögliche Erklärung für den nur geringfügig erhöhten Flux könnte eine mögliche Einschränkung in der Malat-Aspartat Shuttle-Aktivität sein. Während Boxer und Devlin (1961) sowie Perez-Rodriguez et al. (1987) nur geringe Shuttleaktivitäten für Ehrlich Ascites Tumorzellen nachweisen konnten, haben andere Autoren durch verschiedene Methoden gute Malat-Aspartat Shuttle Aktivitäten für einige Tumorzelllinien aufzeigen können (López-

Alarcón und Eboli, 1986, Greenhouse und Lehninger, 1976, Cederbaum und Rubin, 1976, Chiaretti et al., 1979). Wie Kovacevic (1972) feststellte, ist es auch möglich, daß die *in vivo* Aktivität eines sonst aktiven Shuttles aufgrund fehlenden Substratangebots für die Shuttle Enzyme unzulänglich ist. Obwohl die Literatur in dieser Frage kontrovers ist, gibt es bisher noch keine Untersuchungen über BHK-Zelllinien.

#### **4.5.2 Sauerstoffbedarf von PYC2 exprimierenden Zellen in kontinuierlich geführten Kulturen**

Als weiteren Indiz für eine erhöhte Rate oxidativer Phosphorylierung dient die zellspezifische Sauerstoffverbrauchsrate. Die Messung dieser Größe in kontinuierlichen Kulturen zeigte, daß der Sauerstoffbedarf der PYC2 exprimierenden Zellen erhöht war. Nach Miller et al. (1987) sowie Ozturk und Palsson (1990) ist die ATP Produktionsrate direkt proportional zu der Sauerstoffverbrauchsrate (s. Gleichung Abschnitt 3.2.4.3). Durch den erhöhten Sauerstoffbedarf kommt es bei den PYC2 exprimierenden Zellen zu einer höheren ATP Produktionsrate. Dies spiegelte sich in dem erhöhten zellulären ATP Gehalt wider (vgl. Abschnitt 3.2.4.4 und Tab. 3.1). Obwohl die Lactatproduktionsrate ( $q_{\text{Lac}}$ ) und damit die ATP Erzeugung durch die Glycolyse in den PYC2 exprimierenden Zellen gegenüber der Kontrolle erniedrigt wurde, bleibt ihr Einfluß im Vergleich zu der erhöhten oxidativen Phosphorylierungsrate vernachlässigbar.

In Abschnitt 3.2.4.3 wurden abgeschätzte ATP Bildungsraten gegenübergestellt, die zum einen auf die Differenz der Sauerstoffverbrauchsraten der PYC2 exprimierenden Zellen und Kontrollzellen basieren und zum anderen sich von der Differenz der Substratverbrauchsrate der beiden Kulturen herleiten lassen. Dieser Vergleich zeigte, daß es den PYC2 exprimierenden Zellen möglich ist, durch eine erhöhte oxidative Phosphorylierung zu einer zusätzlichen ATP Bildungsrate von  $268 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$  zu gelangen. Würden die PYC2 exprimierenden Zellen dagegen nicht weniger, sondern genauso viel Glucose und Glutamin konsumieren wie die Kontrollzellen, könnten sie aus dieser zusätzlichen Differenz der Substratmengen insgesamt etwa 70 bis  $126 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$  auf dem glycolytischem und glutaminolytischem Abbauweg gewinnen. Dieser

Vergleich zeigt, daß die PYC2 exprimierenden Zellen den geringeren Substratverbrauch durch eine effizientere Glucoseverbrennung kompensieren können. Sie können dadurch sogar zu höheren ATP Bildungsraten gelangen. Diese Schätzung wird von dem erhöhten zellulären ATP Gehalt, der in den PYC2 exprimierenden Zellen gemessen wurde, bekräftigt.

#### 4.5.3 Der zelluläre ATP und GTP Gehalt

Der zellspezifische ATP Gehalt gibt Auskunft über den stationären Energiegehalt einer Zelle. In PYC2 exprimierenden Kulturen kam es zu einer leichten Erhöhung des intrazellulären ATP und GTP Gehaltes gegenüber der Kontrolle. Wie Neermann (1996) und Fiorani et al. (1994) zeigen konnten, besteht ein Zusammenhang zwischen dem glycolytischen Flux und dem ATP Gehalt der Zellen. Mit der Hexokinase I transfizierte Zellen hatten einen bis zu 2,8 fach höheren zellulären ATP Gehalt im Vergleich zu der Kontrolle, was die Verhältnisse der Glucose- und Glutaminverbrauchsraten widerspiegelte (Neermann, 1996). Da es in den PYC2 exprimierenden Kulturen zu einer Verringerung der Glucose- und Glutaminverbrauchsraten gekommen war, darf angenommen werden, daß diese Zellen eine höhere Energieausbeute pro verbrauchte Substrate erzielt haben.

Ein erhöhter intrazellulärer ATP Gehalt kann sich, wie einige Autoren zeigen konnten, positiv auf die Produktivität der Zellen auswirken (Neermann, 1996, Pendse und Bailey, 1994). So konnte Neermann zeigen, daß eine bis zu 3 fache Erhöhung des zellulären ATP Gehaltes die Produktivität eines rekombinanten  $\beta$ -Galactosidase Proteins zwischen 2 und 3 fach erhöhte. Somit kann angenommen werden, daß die Erhöhung des zellulären ATP Gehaltes in PYC2 exprimierende Zellen ebenfalls einen produktionssteigernden Einfluß ausübt.

Die ATP induzierte Erhöhung der Produktivität kann durch Experimente von Jackson (1991) untermauert werden, der zeigen konnte, daß die Translationseffizienz bestimmter mRNA Moleküle direkt von der verfügbaren ATP Menge abhängt. ATP wird hierbei für die Auflösung von Sekundärstrukturen innerhalb der mRNAs verwendet. Die Energieäquivalenten ATP und GTP werden des weiteren für die effiziente Initiation der Transkription (Gassen et al., 1985) sowie bei allen drei Schritten der Translation

---

benötigt (Watson et al., 1987).

#### **4.5.4 Das Lactat/Glucose Verhältnis**

Das Lactat/Glucose Ratio spiegelt die Bildung von Lactat aus verbrauchter Glucose wider. Unter Vernachlässigung des Lactats, das aus Glutamin gebildet werden kann (maximal 13 % der gesamten Lactatbildung, Reitzer et al., 1979), nimmt sie einen maximalen theoretischen Wert von zwei an, bei der jedes Glucosemolekül über die Glycolyse und die LDH Reaktion zu zwei Lactatmolekülen metabolisiert wird. Unter vergleichbaren Kulturbedingungen wurde für die PYC2 exprimierenden Klone ein geringeres Lac/Glc Verhältnis beobachtet als in den Kontrollkulturen. Wird die Bildung des Lactat aus Glutamin als konstant angenommen, muß die Rate der aeroben Glycolyse, die für die Bildung des Lactats verantwortlich ist, abgenommen haben. Der Anteil der Glucose, der nicht zu Lactat abgebaut wurde, kann somit für andere Stoffwechselwege wie den Citratcyclus zur vollständigen Oxidation zu CO<sub>2</sub>, oder den Pentosephosphatweg für die Synthese von Ribose-5-phosphat zur Verfügung gestellt worden sein. Diese Erklärung wird durch eine höhere Sauerstoffverbrauchsrate von PYC2 exprimierenden Zellen unterstützt.

Das Lac/Glc Verhältnis nimmt unterschiedliche Werte in Spinner- und Fermenterkulturen an. So lagen die Lac/Glc Verhältnisse in den Batchkulturen zwischen 1,66 und 1,37, während in kontinuierlichen Kulturen Werte um 0,89 und 1,22 erreicht wurden. Eine bessere Sauerstoffversorgung im Fermenter treibt den Stoffwechsel in Richtung oxidativen Abbau von Substraten (Miller et al., 1987) und führt zu einer verminderten Lactatfreisetzung. Zum anderen ist die Glucosekonzentration im Medium von Batchkulturen, besonders zu Anfang, wesentlich höher als die stationäre Glucosekonzentration in kontinuierlichen Kulturen, was wiederum die ineffiziente Glucoseverbrennung fördert (Häggström et al., 1996, Ljunggren und Häggström, 1994).

## 4.6 Nukleotidpools der PYC2 exprimierenden Zellen

### 4.6.1 Die zellulären UDPGNac Gehalte

Der zelluläre UDPGNac Gehalt einer Zelle hat einen großen Einfluß auf das Wachstum (Valley, 1996, Bekesi et al., 1969, Keppler, 1977) sowie die Glycosylierung (Valley, 1996, Zanghi et al., 1998, Rijcken et al., 1995, Grammatikos et al., 1998, Gawlitzek et al., 1998) von produzierten Proteinen. Entgegen ersten Annahmen waren die intrazellulären UDPGNac Gehalte der kontinuierlich kultivierten PYC2 exprimierenden Zellen gegenüber der Kontrolle bei identischen Kultur- und Medienbedingungen erhöht. Eine Erklärung hierfür gibt der Stoffwechselweg der UDPGNac Bildung, in dem Glucose bzw. das daraus gebildete Fructose-6-phosphat sowie Ammonium als entscheidende Substrate zur Produktion von Vorstufen fungieren. Durch die von der PYC2 Aktivität hervorgerufenen Veränderungen von Stoffflüssen und stationären Pools können bestimmte Enzyme in ihrer Aktivität verändert werden. So ist es denkbar, daß die Phosphofructokinase-Reaktion als ein wichtiger regulatorischer Punkt der Glycolyse durch Inhibitoren wie ATP und Citrat, die ein erhöhtes Energielevel der Zelle simulieren, herunterreguliert wird. Bei gleichbleibend hohen Glucosekonzentrationen im Medium und einem reduzierten glycolytischen Flux kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von Glucose-6-phosphat bzw. Fructose-6-phosphat, welches eine wichtige Vorstufe für die Bildung von UDPGNac darstellt. Eine eingehende Analyse der zellulären Zuckerpools ist jedoch notwendig, um gesicherte Aussagen in dieser Hinsicht treffen zu können.

Eine weitere wichtige Vorstufe des UDPGNac ist das Ammonium, das als Substrat für die Carbamoylphosphat-Synthetase und Glucosamin-6-phosphat-Isomerase Reaktion fungiert (Valley, 1996, Hauser und Wagner, 1997). In Anlehnung an die Zerfallskinetik von Glutamin nach Tritsch und Moore (1962) konnte für die PYC2 exprimierenden Kulturen eine zeitweise erhöhte Ammoniumkonzentration theoretisch ermittelt werden. Denn durch niedrigere Glutaminverbrauchsraten stellten sich höhere stationäre Glutaminkonzentrationen im Kulturmedium ein, die eine höhere Menge an thermischen Zerfallsprodukten ergaben (Tritsch und Moore, 1962, Negrotti et al., 1989). Obwohl die Messungen der Ammoniumkonzentration mit Hilfe der Ammoniumelektrode keine

wesentlichen Unterschiede zwischen der PYC2 und Kontrollkultur aufzeigten, muß man in Betracht ziehen, daß diese Methode mit Schwankungen bis zu einem Faktor von zwei relativ ungenau ist. Aus diesem Grund wurden die theoretisch berechneten Ammoniumkonzentrationen herangezogen (s. Abschnitt 3.2.4.4).

#### **4.6.2 NTP-, U- und NTP/U-Werte**

##### **Der NTP-Wert**

Der NTP-Wert stellt den Quotienten aus Purin- und Pyrimidintriphosphaten dar und kann zur Beurteilung des physiologischen Zustandes einer Zelle herangezogen werden (Ryll, 1992, Ryll und Wagner, 1992). Für die PYC2 transfizierten Zellen war der NTP-Wert während der kontinuierlichen Kulturführung gegenüber der Kontrolle erhöht. Der erhöhte ATP und GTP Pool in den PYC2 exprimierenden Zellen bei weitestgehend gleichbleibendem UTP Pool erklärt den höheren NTP-Wert. Die zusätzlichen ATP und GTP Mengen in den PYC2 exprimierenden Zellen könnten aus der oxidativen Phosphorylierung und dem Citratcyclus herrühren. Die Erhöhung des NTP-Wertes tritt häufig gegen Ende einer Batchkultivierung auf und ist ein Zeichen für die Verschlechterung des physiologischen Zustandes der Zelle sowie des Wachstums. Sie geht dabei mit einer Abnahme des Pyrimidintriphosphatpools einher (Ryll, 1992, Ryll und Wagner, 1992). In der Kultivierung von PYC2 exprimierenden Zellen jedoch kam es zu einer Erhöhung der Purintriphosphatpools ohne eine wesentliche Änderung der Pyrimidintriphosphate. Somit handelte es sich nicht um eine Verschlechterung des physiologischen Zustandes der Zellen. Vielmehr ist die Verbesserung des Energiepools die Ursache für den erhöhten NTP-Wert.

##### **Der U-Wert**

Der U-Wert gibt das Verhältnis zwischen UTP und UDPGNac wieder und verhält sich häufig entgegengesetzt zum NTP-Wert (Ryll, 1992, Ryll und Wagner, 1992). In den kontinuierlichen Kulturen wurden durchgängig niedrigere U-Werte für die PYC2 exprimierende Kultur ermittelt, was sich durch den Anstieg des UDPGNac Spiegels in den stoffwechselspezifisch veränderten Zellen bei konstantem UTP Gehalt erklären läßt. Ein Anstieg des UDPGNac Gehaltes von Zellen führt zur Einschränkung des

Zellwachstums (Ryll, 1992). In diesem Fall jedoch kann der Einfluß auf das Zellwachstum nicht beobachtet werden, da es sich um einen Chemostatversuch handelt, bei der die Wachstumsgeschwindigkeit durch die eingestellte Bleedingrate vorgegeben wird.

Auf die Ursachen der Erhöhung des UDPGNAC Gehaltes wurde im vorhergehendem Abschnitt näher eingegangen. Da die Zellvitalität durch eine Erhöhung des UDPGNAC Gehaltes beeinträchtigt wird, sollte bei der Kultivierung PYC2 exprimierender Zellen die Ausgangskonzentration von Glutamin im Kulturmedien erniedrigt werden, um damit die Ammoniumfreisetzung herabzusetzen.

### **Der NTP/U-Wert**

Die für den NTP- und U-Wert dargestellten Ergebnisse lassen sich besonders deutlich an dem NTP/U-Wert zeigen. Der NTP/U-Wert stellt einen verlässlichen Parameter zur Beurteilung des Wachstumszustandes dar (Ryll und Wagner, 1992). Durch die Division der Einzelparameter NTP- und U-Wert kommt es zu einer Amplifikation ihrer Verhalten, und die Unterschiede der Kulturen werden besonders deutlich erkennbar. Die PYC2 exprimierenden Zellen hatten als eine Folge der Erhöhung des NTP-Wertes und der Erniedrigung des U-Wertes einen erhöhten NTP/U-Wert gegenüber den Kontrollzellen.

## **4.7 rhuEPO Expression und das Verhalten der Produktivität PYC2 exprimierender Zellen**

### **4.7.1 Nachweis der rhuEPO-Expression**

Die erfolgreiche Expression des rhuEPO wurde durch Western Blot Analyse sowie ELISA Untersuchungen gezeigt. Außerdem war es wichtig zu zeigen, daß das exprimierte EPO-Protein in den stoffwechselspezifisch veränderten PYC2 exprimierenden Zellen intakt und vollständig glycosyliert war. Es wurde deshalb Wert auf die vollständige Glycosylierung gelegt, da sie gerade beim rhuEPO Molekül für die biologische Aktivität von großer Bedeutung ist (Wasley et al., 1991, Misaizu et al., 1995, Tsuda et al., 1990, Yamaguchi et al., 1991). In diesem Sinne bietet das rhuEPO



einen guten Modellcharakter für andere Zielproteine.

Unterschiede in der Glycosylierung des von den PYC2 exprimierenden Zellen produzierten rhuEPO konnten nicht festgestellt werden. Dies konnte durch einen Vergleich der Wanderungstrecken des in den Kontrollzellen sowie in den PYC2 Zellen exprimierten rhuEPO und dem Standard rhuEPO auf Western Blots gezeigt werden (vgl. Abb. 3.3.2). Identische Wanderungstrecken des vollkommen unglycosylierten Proteins zeigten außerdem für beide Kulturen, daß es keine Größenunterschiede des exprimierten unglycosylierten Proteins gab. Weiterhin konnte mit Hilfe eines PNGase F-Verdaus gezeigt werden, daß die exprimierten rhuEPO-Moleküle sowohl N- als auch O-Glycosylierungen aufwiesen. Der Anteil an rhuEPO-Proteinen ohne O-Glycosylierung war in den PYC2 sowie Kontroll-BHK-21 A Zellen jedoch höher als in dem verwendeten rhuEPO-Standard. Das scheint allerdings ein zellinienspezifischer Unterschied zu sein, da er für die Kontroll- und PYC2-Zellen gleichermaßen zutraf. Diese Ergebnisse zeigen, daß die exprimierten Proteine intakt waren und auch N- und O-glycosyliert wurden. Um eine genaue Aussage über das Verteilungsmuster der einzelnen Glycostrukturen machen zu können und einen Vergleich zwischen der Antennarität, der Zusammensetzung und des Sialylierungsgrades anzustellen, müßten Untersuchungen mit Hilfe der komplexen Methoden der Glycoanalytik erfolgen wie IEF (Gokana et al., 1997) und Kapillarelektrophorese (Watson und Yao, 1993, Bernd Hilger, persönliche Kommunikation, 1997) für die Isoformen sowie HPAEC-PAD für den Ladungszustand und Strukturen (Hardy et al., 1988, Schlenke, 1996) und MALDI/TOF-MS (Hakomori, 1964, Nimtz et al., 1993) für die Monosaccharidzusammensetzung der Glycostrukturen.

#### **4.7.2 Stabilität von Zelllinien**

Eine wichtige Frage, die sich bei Transfektionen und der Langzeitkultivierung von genetisch veränderten Zellen stellt, ist die Stabilität der integrierten Fremd-DNA. Die Chemostatkultivierung von Zellen, die mit dem bicistronischen Plasmid transfiziert waren, zeigte sowohl durch FACS als auch durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, daß die Expression des Reporterproteins EGFP über die ungefähr

drei Wochen anhaltende Kultivierung ohne die Anwendung von Selektionsmedium stabil blieb. Über diesen Zeitraum hinausgehende Kultivierungen hatten ebenfalls stabile rhuEPO-Expressionen, wie die ELISA Untersuchungen gezeigt haben. Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu den von Neermann (1996) und Schlenke (1999) gefundenen Daten, die in kontinuierlichen Kulturen trotz fehlenden Selektionsdrucks eine langanhaltende Luciferase- bzw. EPO-Produktion nachweisen konnten.

#### **4.7.3 Produktionsverhalten in batch und fed-batch Kulturen**

Die Ergebnisse der unterschiedlichen Experimenten zur Produktivität zeigten, daß die PYC2 exprimierenden Zellen bei verschiedenen physiologischen Bedingungen unterschiedlich bezüglich der Produktion von rhuEPO reagierten. Unter bestimmten Kultivierungsbedingungen kommt es zu ganz bestimmten reproduzierbaren Effekten. Aus diesem Grund wird die folgende Diskussion nach den unterschiedlichen Kultivierungstypen eingeteilt.

##### **Batchkultivierung**

Im Satzbetrieb kultivierte PYC2-rhuEPO Zellen, zeigten die bereits zuvor diskutierten metabolischen Vorzüge wie eine verringerte Substratverbrauchsrate sowie Lactatproduktionsrate. In der PYC2 exprimierenden Kultur konnte trotz eines verlängerten Wachstumszyklus eine geringere rhuEPO-Konzentration und Gesamtausbeute erreicht werden wie in der Kontrollkultur. Obwohl die zellspezifischen rhuEPO-Produktionsraten in beiden Kulturen ähnlich waren, kam es zu einer schnelleren rhuEPO Anreicherung in der Kontrollkultur. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine gegenüber der Kontrolle verlängerte Adaptationsphase der PYC2 exprimierenden Kultur sein, die etwa 45 h dauerte. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Produktion und der Summe aus den Produkten der lebend-Zellkonzentration und der Kultivierungsdauer (=Integral unter der Wachstumskurve, Renard et al., 1988). Der Vergleich dieses Integrals für beide Kulturen zeigt, daß die PYC2 exprimierende Kultur eine deutlich kleinere Fläche aufweist, die mit dem langsameren Wachstum zu erklären ist. Der Unterschied der Vitalität der Kulturen gegen Ende des Versuches macht sich dabei nicht sehr stark

bemerkbar.

Die verlängerte Adaptationsphase der PYC2 exprimierenden Kultur könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, daß die zwei Kulturen sich in verschiedenen Passagezahlen befanden.

### **Glutaminlimitierte fed-batch Kultivierung**

Viele industrielle Herstellungsverfahren werden in fed-batch Modus durchgeführt. Dabei wird der Kultur nach und nach Mediumkonzentrat zugesetzt (Bibila et al., 1994). In einer glutaminlimitierten fed-batch Kultivierung konnte die Produktivität von PYC2 exprimierenden Zellen untersucht werden. Bei gleicher Produktivität hatte die PYC2 exprimierende Kultur eine verlängerte stationäre Phase des Zellwachstums. In industriellen Produktionsprozessen wird die Kultivierung häufig bei Erreichen von 80 % Zellvitalität abgebrochen. Mit abnehmender Vitalität der Kultur ist die Integrität der Zellen nicht länger gewährleistet. Es kommt bei der Zellyse zum Austreten von intrazellulären Proteasen in den Kulturüberstand, die das sekretierte Proteinprodukt angreifen und zerstören können. Mit der Zellyse werden aber auch intrazelluläre Zielproteine freigesetzt, die noch nicht vollständig prozessiert, d.h. ordnungsgemäß gefaltet und vollständig glycosyliert sind. Unter der Bedingung, daß die Kultivierung beim Erreichen von 80 % Vitalität beendet wird, konnte die PYC2 exprimierende Kultur zu einer 1,4 fach höheren Produktkonzentration und -ausbeute gelangen wie die Kontrollkultur. Somit zeigte sich, daß die von der PYC2 metabolisch veränderten Zellen gut geeignet sind, um unter glutaminlimitierten Bedingungen zu hohen Produktausbeuten zu gelangen. Niedrige Glutaminkonzentrationen im Medium können sehr von Vorteil sein, da es dadurch einerseits zu einem höheren Maß an oxidativem Glutaminabbau kommt (Ljunggren und Häggström, 1994), und andererseits die Ammoniumfreisetzung durch den thermischen Zerfall von Glutamin verringert wird.

## **4.7.4 Verlauf der Produktivitäten in kontinuierlich perfundierten Kulturen**

### **Produktion in perfundierten Kulturen bei gleichen Zellkonzentrationen**

Das Produktionsverhalten in Perfusionskulturen sollte in Verbindung mit dem

Wachstum beurteilt werden. In einem vergleichendem Perfusionsexperiment mit gleicher Wachstumsrate und gleichen Zellkonzentrationen in der PYC2 exprimierenden Kultur sowie der Kontrollkultur konnten für die metabolisch veränderten Zellen zweifache Produktkonzentrationen und Produktausbeuten erzielt werden.

Diese Eigenschaft der PYC2 exprimierenden Zellen ist besonders nützlich, da sie bei gleichem Zeit- und Medienaufwand zu doppelten Produktausbeuten führt, und wie bereits zuvor erwähnt, die Kosten der industriellen Produktion auf die Hälfte reduzieren kann. Eine erhöhte Produktkonzentration bringt darüber hinaus Vorteile bei der Wahl der Aufreinigungsmethode und bei den Wiederfindungsraten des Produktes, wodurch abermals erhöhte Produktausbeuten erzielt werden könnten.

#### **Produktion in Perfusionskultur bei identischen Perfusionsraten**

Wurden identische Perfusionsraten eingestellt, konnte wiederholt beobachtet werden, daß die PYC2 exprimierenden Zellen höhere Zellkonzentrationen in der Kultur erreichten. Die sich einstellenden Konzentrationen waren dabei im Vergleich zur Kontrolle 1,5 fach für die PYC2-rhuEPO Kulturen, und 2,4 fach für die PYC2 exprimierenden Kulturen, erhöht. Ist das erwünschte Produkt bei einem Produktionsprozeß die Zellmasse, ist dieses Verfahren gut geeignet, um bei gleichem Zeit- und Medienaufwand zu deutlich höheren Zellausbeuten zu gelangen. Dies gilt unter der Voraussetzung, daß die Zellen oder das intrazelluläre Produkt der Zellen durch die PYC2 nicht beeinflußt oder negativ verändert werden. Auch in diesem Fall könnten die Produktionskosten deutlich verringert werden.

Die zellspezifische Produktivität des rekombinanten rhuEPO-Proteins im kontinuierlich perfundierten Reaktor bewegte sich in der PYC2-rhuEPO Kultur bei gleicher Perfusionsrate und höherer Wachstumsrate um den gleichen oder einen niedrigeren Wert als in der Kontrollkultur (s. Abb. 3.3.8.2 und 3.3.8.3 unten). Es wurden dabei keine höheren rhuEPO-Ausbeuten erzielt als in den Kontrollkulturen. Im kontinuierlich perfundierten Reaktor sollte also für die PYC2 exprimierenden Zellen versucht werden, das Zellwachstum gering zu halten. Die Erzeugung großer Zellmassen bei der Produktion von sekretierten rekombinanten Proteinen ist ohnehin wenig sinnvoll, da nur das sekretierte und vollständig post-translational prozessierte Protein von Interesse

ist. Es ist denkbar, daß es zu jeder Zellkonzentration im Reaktor eine optimale Perfusionsrate gibt, bei der die maximal mögliche Produktivität und möglichst minimale Wachstumsrate erreicht werden kann. Es ist in diesem Zusammenhang weiterhin sinnvoll zu untersuchen, ob die Produktivität der kontinuierlich perfundierten PYC2-rhuEPO Kulturen im Zustand der stationären Wachstumsphase maximal ist. Dazu sollte das Wachstum in der Kultur zunächst gefördert werden bis hohe Zellkonzentrationen erreicht sind, anschließend sollte die Perfusionsrate so weit gedrosselt werden, daß die Zellen in die stationäre Wachstumsphase gelangen und nunmehr die Produktionsphase eingeleitet werden kann.

Ähnliche Beispiele in der Literatur, bei denen sich die Produktivität auf Kosten des Wachstums erhöhen ließ, finden sich für die Produktion von tPA mit einer Vitreoscilla Hämoglobin exprimierenden CHO Zelllinie (Pendse und Bailey, 1994) und die Produktion von  $\beta$ -Galactosidase mit einer rekombinanten Hexokinase I exprimierenden BHK-Zelllinie (Neermann, 1996).

#### **Ist die rhuEPO-Produktion vom Wachstum abhängig?**

Aus Produktivitätsuntersuchungen in Batchkulturen konnte ersehen werden, daß eine rhuEPO-Produktion auch in stationären Wachstumsphasen erfolgt ist (s. Abschnitt 3.3.4 und 3.3.9). Die bereits in den letzten zwei Teilabschnitten (s. Abschnitt 4.7.4) diskutierten Perfusionsversuche zeigen ebenfalls, daß eine Steigerung der Zellwachstumsrate nicht mit einer Zunahme der Produktivität einherging. Daraus kann auf eine weitestgehend wachstumsunabhängige rhuEPO-Produktion geschlossen werden.

#### **Die PYC2-Expression bewirkt entweder besseres Wachstum oder bessere Produktion. Gibt es einen Wechsel zwischen Wachstum und Produktion?**

Wie bereits im oberen Teil dieses Abschnitts diskutiert, zeigten die metabolisch veränderten Zellen in Perfusionsreaktoren unterschiedliches Verhalten. Wurde die Perfusionsrate so gewählt, daß das Wachstum mit der Kontrolle vergleichbar war, konnten höhere Produktivitäten und rhuEPO-Ausbeuten als für die Kontrolle erzielt werden (vgl. Abschnitt 3.3.7). Dagegen war die Produktivität geringer, wenn die PYC2 exprimierenden Kulturen bei etwas höheren Perfusionsraten wesentlich höhere

Zellkonzentrationen erreichen. Wie kommt es zu diesen verschiedenen Zuständen? Die von einer Zelle verwendete Energiemenge wird für die Erhaltung, das Wachstum und die Produktion des erwünschten Proteins verwendet (Pirt, 1975). Somit konkurriert das Wachstum mit der Proteinproduktion, die einen erheblichen Anteil der zur Verfügung stehenden Energie verbrauchen kann (Glacken, 1988). Wird der den Zellen zur Verfügung stehende ATP Gehalt, zu einem großen Teil für das Wachstum verwendet, bleiben geringere Energiemengen für die Produktion übrig. Wie gezeigt werden konnte, sind die PYC2 exprimierenden Zellen in der Lage, mit der Verwertung geringerer Substratmengen zu leicht höheren ATP Gehalten als die Kontrolle zu gelangen (s. Abschnitt 4.5.3). Dieser zusätzlich gewonnene Energiepool kann entweder in das Wachstum oder die Proteinproduktion investiert werden. Es stellt sich daher die Frage, welcher Parameter den Ausschlag für eine Erhöhung der Wachstumsrate auf Kosten der Proteinproduktion gibt. Bisher gibt es zu dieser speziellen Thematik keine Literatur. Man kann sich jedoch vorstellen, daß sich durch den geringeren Verbrauch an Substraten höhere stationäre Substratkonzentrationen im Medium einstellen. Diese Substrate können entweder für die Energieerzeugung in Form von ATP verwendet werden, das für die Proteinproduktion eingesetzt werden kann, oder überschüssige Glucose kann in Stoffwechselwege eingeschleust werden, die nicht vorrangig der ATP Erzeugung dienen, wie z.B. der Pentosephosphatweg, die Lipidsynthese oder die Proteinglycosylierung. Dabei würden diese Stoffwechselwege Bausteine wie modifizierte Zucker, Lipide und Nukleinsäuren für das Zellwachstum liefern. Die Gewinnung von zusätzlichem ATP könnte dabei wie Versuche von Neermann (1996) mit  $\beta$ -Galactosidase sowie Pendse und Bailey (1994) mit rekombinantem tPA gezeigt haben sehr wohl die Produktion des rekombinanten Proteins steigern, jedoch das Zellwachstum nicht fördern (Neermann, 1996, Neermann und Wagner, 1996). Die Verwertung der aus Glucose gewonnenen Zellbausteine für das Wachstum ist möglicherweise durch bestimmte wachstumsfördernde Faktoren wie z.B. einige essentielle Aminosäuren oder Wachstumsfaktoren aus dem Serum limitiert (Ljunggren und Häggström, 1995). Werden diese Substanzen nicht zur Verfügung gestellt, wird die verfügbare Glucose zur Energiegewinnung und Produktion verwendet. Wird dagegen die Begrenzung dieser Metabolite durch eine Erhöhung der Perfusionsrate aufgehoben, kann Glucose in zellaufbauende Stoffwechselwege

geleitet werden. Obwohl die Aufteilung des zur Verfügung stehenden Energiepools für die Prozesse Wachstum, Erhaltung und Produktion plausibel ist, gibt es Zellen, bei denen eine extrem hohe Proteinproduktionsrate bei guten Wachstumsraten beobachtet werden. So können beispielsweise Hybridomzellen eine zellspez. Antikörperproduktionsrate von bis zu  $4,27 \times 10^{-2} \text{ ng s}^{-1} 10^{-6}$  bei einer Wachstumsrate von  $\mu = 0,99 \text{ d}^{-1}$  aufweisen (Lee et al., 1991). Im Vergleich dazu produzierten die eingesetzten BHK-21 A Zellen um einen Faktor von etwa  $10^5$  schlechter (s. Abb. 3.3.7.2a). Solch hohe Produktivitäts- und Wachstumsraten lassen vermuten, daß die Zelle noch über genügend Energiereserven verfügt, um die Produktivität zu erhöhen, und daß es möglicherweise noch andere Faktoren gibt, die die Produktivität beeinflussen.

Um daher die Annahme einer Wechselwirkung zwischen Wachstum und Produktion zu bestätigen und aufzuklären, ist eine Wiederholung der Fermentationsversuche (vgl. Abschnitt 3.3.7 und 3.3.8) sowie eine Reihe weiterer Untersuchungen unter der Verwendung von Zellen mit hohen PYC2 Expressionsraten in Zukunft notwendig. So könnte der impulsartige Zusatz von Wachstumsfaktoren, Aminosäuren oder Serum in kontinuierlich perfundierten PYC2 exprimierenden Kulturen, die die gleiche Wachstumsraten aufweisen wie die Kontrolle, die Frage nach der Limitierung von wachstumsfördernden Substanzen klären.

#### **Abhängigkeit der rhuEPO-Produktion von der Glucosekonzentration im Medium**

Als Reaktion auf den Zusatz von Glucose zu kontinuierlich perfundierten Kulturen konnte eine Erhöhung der zellspezifischen rhuEPO-Produktivität in der Kontrollkultur beobachtet werden. Die PYC2 exprimierenden Zellen dagegen reagierten kaum auf eine Steigerung der Glucosekonzentration. Unter glucoselimitierten Bedingungen bewährten sich die PYC2 exprimierenden Zellen durch die Aufrechterhaltung einer konstanten Produktivität, die höher als die der Kontrolle lag. Dieses Ergebnis legt nahe, daß die PYC2 exprimierende Kultur auch bei geringen Glucosekonzentrationen ein genügend hohes Energieniveau zur konstanten Produktion aufrechterhalten kann. Die Zufuhr weiterer Energiequellen zu PYC2 exprimierende Kulturen dagegen, läßt die Produktivität unbeeinflusst, da bereits genügend Energieressourcen vorhanden sind, und eine weitere Erhöhung der Produktivität nicht möglich ist. Bei der Kontrollkultur

dagegen kann die Glucosesupplementierung zur Gewinnung von benötigter Energie beitragen, was die Produktivität begünstigt. Die Produktion von rhuEPO ist also von Glucose als Grundbaustein nicht merklich abhängig. Glucose jedoch kann die benötigte Energie für deren Produktion liefern.

#### **4.7.5 Industrielle Relevanz und Anwendungsmöglichkeiten**

Um die bislang geschilderten Ergebnisse in den Kontext industrieller Anwendungsmöglichkeiten zu zeigen, wird an dieser Stelle zunächst die bisherige Situation dargestellt. Bei der Produktion vieler rekombinanter Proteine stellt insbesondere die Reduktion der Ammonium- und Lactatfreisetzung eine wichtige Zielsetzung dar.

Um die Produktion dieser durch die Stoffwechselaktivität der Zelle entstehenden Nebenprodukte unter Kontrolle zu bekommen, werden häufig fed-batch Prozesse mit limitiertem Energiequellenangebot eingesetzt (Kurokawa et al., 1994, Ljunggren und Häggström, 1994 und 1995). Dabei werden die in limitierten Konzentrationen vorliegenden Substrate Glucose und Glutamin besonders effektiv, d.h. möglichst oxidativ unter der Gewinnung eines hohen Energiebetrages metabolisiert. Darüber hinaus wird die Ammoniumfreisetzung durch den thermischen Zerfall von Glutamin im Medium reduziert. Es gibt die Möglichkeit, die entstehenden Nebenprodukte mit Hilfe von verschiedenen technischen Mitteln aus dem Reaktor zu entfernen (Capiaumont et al., 1995, Chang et al., 1995a und 1995b). Dazu bedürfte es komplizierter und verlässlicher Meß-, Regel- und Dosierstationen, wodurch der Betrieb erschwert und die Betriebskosten der Kultivierung erhöht würden.

Der Einsatz von metabolisch verbesserten Zellen wie die verwendete PYC2 exprimierende Zelllinie könnte durch eine Minderung der Freisetzung dieser Nebenprodukte die Lebensdauer des Produktionssystems erhöhen. Außerdem bedarf ein solchermaßen verbessertes Kultursystem einer weniger intensiven Regelung und Steuerung, da sich einige Prozeßparameter wie der pH-Wert oder die Substratkonzentration mit kleinerer zeitlicher Rate ändern. Dadurch ist diese Zelllinie weniger anspruchsvoll im Hinblick auf eine exakte Prozeßkontrolle. Die größten Vorteile jedoch, die diese metabolisch veränderte Zelllinie bringt, sind die Senkung von



Produktionskosten sowie des Zeit- und Arbeitsaufwandes durch das Erzielen von höheren Produktausbeuten entweder durch verlängerte Produktionsphasen oder durch eine effektivere Ausnutzung des Medienvorrats. Weiterhin bewirkt die Minderung der Ammoniumfreisetzung und die damit einhergehende geringere Änderung der Kultivierungsbedingungen über die Kultivierungsdauer eine Erhöhung der Produktintegrität und -qualität. Durch die Limitierung der Ammoniumbildung kann nämlich über einen längeren Zeitraum ein relativ hoher Sialylierungsgrad der Glycoproteine aufrecht erhalten werden. Darüber hinaus kommt es im Laufe der Kultivierung zu einer homogeneren Verteilung, d.h. kleineren Diversität der Glycoformen des produzierten Proteins. Somit wird eine gleichbleibende Produktqualität gewährleistet und die Kontrolle über die Produktqualität im Laufe eines Produktionsprozesses erleichtert.

Ein anderer Ansatz zur Verbesserung der Produktqualität wurde von Schlenke demonstriert (Schlenke, 1999, Schlenke et al., 1999). Durch die Einführung einer humanen  $\alpha$ -2,6-Sialyltransferase ST6Gal I konnte er den Sialylierungsgrad von rekombinantem humanen EPO steigern.

Der Einsatz der durch die PYC2 metabolisch veränderten Zelllinien eignet sich für die Produktion vieler zellkulturtechnisch hergestellten Proteine. Eine besonders nützliche und aktuelle Einsatzmöglichkeit könnte die Herstellung von Adenoviren für Zwecke der Gentherapie sein. Als junges und vielversprechendes Forschungsgebiet stellt sich die Produktion der Adenovirenpartikel durch Verpackungszelllinien als nicht unproblematisch dar. Die Synthese und der ordnungsgemäße Zusammenbau von Adenovirenpartikel ist ein stark energiegetriebener Prozeß (Amine Kamen, persönliche Kommunikation). Bisherige Produktionsverfahren führten nur zu sehr geringen Ausbeuten an funktionstüchtigen Viruspartikeln (Coté et al., 1997). Um ausreichende Ausbeuten zu erhalten, ist es wünschenswert, Fermentationen bei höheren Zellkonzentrationen durchzuführen (Garnier et al., 1994). Dabei werden jedoch unter anderem so hohe Lactatkonzentrationen erreicht, daß die Vitalität und Produktivität der Zellen beeinträchtigt werden (Charles Goochee, persönliche Kommunikation, Garnier et al., 1994) und die Standzeiten des Bioreaktors somit verkürzt werden. Der Einsatz von PYC2 exprimierenden Zellen könnte die Lactatfreisetzung deutlich reduzieren und

---

damit die Produktivität und Lebensdauer der Kultur erhöhen. Es ist weiterhin möglich, durch den Einsatz von PYC2-Kulturen mit einem begünstigten ATP und Energiehaushalt zu einem effizienteren Zusammenbau von Adenovirenpartikel zu gelangen.

Eine Zelllinie mit der Expression rekombinanter Hexokinase und PYC2 ist eine weitere denkbare Möglichkeit, die Adenovirusherstellung zu verbessern. Durch einen erhöhten glycolytischen Flux und eine gleichzeitig effizientere Glucoseverwertung könnte es zu einem deutlich erhöhten ATP Gehalt der Zellen kommen.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Ansatz gemacht, den Primärstoffwechsel von kontinuierlichen tierischen Zelllinien an einer zentralen Stelle des Stoffwechsels durch die Einführung einer Pyruvat-Carboxylase gezielt zu verbessern. Dadurch sollte eine enzymatische Verbindung zwischen der Glycolyse und dem Citratcyclus wiederhergestellt werden. Es konnte gezeigt werden, daß die veränderten Zellen verringerte Substratverbrauchsraten aufwiesen. Das manifestierte sich besonders bei Batchprozessen mit einer bis zu vierfachen Verbesserung des Glucose- und zweifachen Reduzierung des Glutaminverbrauchs. Die Lactatproduktionsrate sank analog zum Glucoseverbrauch. Zusätzlich dazu wurde der Lactat pro Glucose Quotient in den PYC2 exprimierenden Zellen verringert, was als eine Abnahme der aeroben Glycolyserate gedeutet werden konnte. Als Folge eines verringerten Substratkonzsums stellten sich im Medium höhere Konzentrationen der verbleibenden Substrate ein. Mit einer Verbesserung der Substratverwertung ging ebenfalls eine Erhöhung des intrazellulären ATP und GTP Gehaltes um das 1,4 bzw. 1,3 Fache einher. Diese Beobachtungen können auf eine Erhöhung des Flux´ von Glucose und Pyruvat in den Citratcyclus zurückgeführt werden, was durch Fluxanalysen mit <sup>14</sup>C-radioaktiv markierten Substraten gezeigt wurde. Eine bis zu 2,9 fache Erhöhung des Sauerstoffbedarfs in PYC2 exprimierenden Kulturen deutet dabei auf eine Erhöhung der oxidativen Phosphorylierung hin. Die Folge des Pyruvat-Carboxylase Eingriffs waren eine verlängerte Periode hoher Zellvitalität bei geringerer Lactatproduktion in Batchprozessen und eine erhöhte Zellkonzentration oder Produktausbeute in Perfusionsreaktoren. In der produktionstechnischen Anwendung bedeutet es, daß satzweise betriebene Produktionsprozesse verlängert werden können, womit die Raum-Zeit-Ausbeute des Bioreaktors erhöht wird. Durch die Einsparung von Zeit sowie Medien- und Arbeitskosten können Produktionsprozesse kostengünstiger gestaltet werden. Eine weitere Konsequenz aus der effizienten Substratverwertung ist die Möglichkeit der Senkung der Glutaminkonzentration im Medium und damit der Verringerung der Ammoniumfreisetzung bei gleichbleibender Produktivität der Zellen. Selbst unter limitiertem Energiezufuhr kann die Zellvitalität länger aufrecht erhalten

werden als in Kontrollkulturen. Der Mangel an Energie aus Glutamin kann in diesen Zellen durch einen oxidativen Abbau von Glucose ersetzt werden.

Das Verhalten der Produktion PYC2 exprimierender Zellen wurde anhand von rhuEPO als Modellglycoprotein untersucht. Das rhuEPO Protein wurde vollständig N- und O-glycosyliert und ins Medium sekretiert. Die Vorteile der Produktivität PYC2 exprimierender Zellen konnten am besten unter Perfusionsbedingungen erreicht werden, wo etwa doppelt so hohe rhuEPO-Ausbeuten erzielt wurden. In Perfusionskulturen wurde außerdem eine Abhängigkeit der Produktivität bzw. Gesamt rhuEPO-Ausbeute vom Wachstumsverhalten beobachtet. Im Vergleich zur Kontrollkultur wurden bei kleineren Wachstumsraten höhere rhuEPO-Ausbeuten erhalten, während bei höheren Wachstumsraten im Vergleich zur Kontrolle eine geringere rhuEPO-Produktion erzielt wurde. Die Umstellung zu einem dieser beiden Zustände scheint mit der Perfusionsrate bzw. der Konzentration einer limitierenden Substanz im Medium zusammenzuhängen. Durch die erhöhte Produktivität der Zellen und damit auch erhöhten Produktkonzentrationen in der Ernte ist es möglich, Produktionskosten zu senken und die Aufarbeitung des gewonnenen Produktes zu erleichtern. Ein weiterer Vorteil der PYC2 exprimierenden Zellen in der Produktion wurde für glutaminlimitierte fed-batch Prozesse gezeigt. Durch eine gegenüber der Kontrollkultur verlängerte Kulturführung wurden bei gleicher Produktivität ungefähr 1,4 mal höhere rhuEPO-Ausbeuten erreicht.

Die Klonierung der Pyruvat-Carboxylase in tierischen Zellen zeigte, daß eine Veränderung des Primärmetabolismus ohne eine lethal wirkende Störung der Stoffflüsse in der Zelle möglich ist, und eröffnet damit Wege für weitere Metabolic Engineering Ansätze am Primärstoffwechsel. Durch gezielte genetische Eingriffe können somit Zellen zu besserem Wachstum, kontrollierbarer Produktion und Endproduktfreisetzung geführt werden.

Für eine effektivere Nutzung der Hefe-Pyruvat-Carboxylase Strategie bedarf es einer Verbesserung der Expressionsrate des PYC2. Da schon bei kleinen PYC2-Expressionsraten vielversprechende Ergebnisse erzielt wurden, sollten zukünftige

Arbeiten auf eine effizientere Expression desselben Enzyms konzentriert werden. Um den Einfluß einer höheren Expression auf die metabolischen Daten im Vorfeld zu untersuchen, können die Genexpression erhöhende Substanzen wie Butyrat oder Trichostatin A eingesetzt werden (Kooistra et al., 1987, Dorner et al., 1989, Furukawa et al., 1995). Weiterhin sollten Versuche unternommen werden, den Einfluß hefespezifischer Codons auf die Transkription sowie der Translation zu vermindern (s. Abschnitt 4.1). Vom metabolischen Gesichtspunkt ist es wichtig herauszufinden, ob Engpässe bei bestimmten Enzymschritten auftreten können. Dazu sollten die Pools der direkt auf die Reaktion der Pyruvat-Carboxylase folgenden Intermediate wie Oxalacetat und Malat untersucht werden. Akkumulieren bestimmte Intermediate im Vergleich zur Kontrolle, gibt es einen weiteren geschwindigkeitsbestimmenden Schritt oder einen sogenannten "Flaschenhals" (Bottleneck) beim Fluß der Metabolite. Die genaue Untersuchung des Malat-Aspartat Shuttles kann ebenfalls Aufschluß über weitere Bottlenecks liefern (s. Abschnitt 1.1.1 und 4.5.1). Um die Produktionseigenschaften der PYC2 exprimierenden Zellen genauer zu verstehen, und ihr Produktionspotential besser nutzen zu können, sollte untersucht werden, welche Parameter oder welcher Zustand zur Förderung der Proteinproduktion und des Zellwachstums führen. Weitere Perfusionsversuche mit kurzzeitiger Erhöhung von Supplementkonzentrationen sollten zeigen, ob Wachstumsfaktoren oder vielleicht Aminosäuren die limitierenden Faktoren beim Wachstum sind. Auf diese Weise wäre es möglich, durch eine gut optimierte Fütterungsstrategie die Zellen entweder zum Wachstum oder zur Produktion zu dirigieren.

Im Hinblick auf die industrielle Anwendung dieser Metabolic Engineering Strategie ist die Untersuchung des Einflusses der PYC2 auf die wichtige Produktionszelllinie CHO von Interesse. In diesem Zusammenhang kann es außerdem von Vorteil sein, daß das PYC2 Gen mit Hilfe von Methotrexat in dhfr-defizienten Zellen amplifizierbar ist. Weiterhin könnte der Einsatz von bicistronischen Vektoren, die zum einen das erwünschte rekombinante Protein und zum anderen die PYC2 exprimieren, die Zahl der benötigten Transfektionen zur Einführung der Fremdgene in eine Produktionszelllinie reduzieren. Bei der Cotransfektion des Vektors mit einem Resistenzgenplasmid kommt es zu einem Transfer von drei anstelle von vier Genen,

---

wenn beide Gene in zwei aufeinanderfolgenden Transfektionen eingeführt werden. Somit wird die Produktionskapazität der Zelle weniger in Anspruch genommen und es bleiben mehr verfügbare Energie und Ressourcen für die Produktion gewünschter rekombinanter Proteine.

Hinsichtlich der kommerziellen Bedeutung metabolisch verbesserter Zelllinien sollten weitere Versuche zur Verbesserung der Expression der Pyruvat-Carboxylase unternommen und eine Reihe weiterer Zelllinien untersucht werden.

---

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ahmad, F., Ahmad, P. M., Mendez, A. Rat liver pyruvate carboxylase. Purification, detection and quantification of apo and holo forms by immunoblotting and by an enzyme linked immunosorbent assay. Biochem. J. 1986; 236:527-533.
2. Atkin, M. B, Utter, F. M., Weinberg, B. M. Pyruvate Carboxylase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase activity in Leukocytes and fibroblasts from a patient with pyruvate carboxylase deficiency. Pediat. Res. 1979; 13:38-43.
3. Bailey, J. E. Towards a science of metabolic engineering. Science. 1991; 252:1668-1675.
4. Ballard, F. J., Hanson, R. W. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in developing rat liver. Biochem. J. 1967; 104:866-871.
5. Barden, R. E., Scrutton, M. C. Pyruvate Carboxylase from chicken liver. Effects of univalent and divalent cations on catalytic activity. J. Biol. Chem. 1974; 249(15):4829-4838.
6. Bartos, D., Vlessis, A. A., Muller, P., Mela-riker, L., Trunkey, D.-D. Microassay of decarboxylation reactions in cultured cells. Analytical Biochemistry. 1993; 213:241-244.
7. Bekesi, J. G., Bekesi, E., Winzler, R. J. Inhibitory effect of Metabolic engineering of animal cells - glucosamine and other sugars on the biosynthesis of protein, ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid in normal and neoplastic tissues. J. Biol. Chem. 1969; 244(14):3766-3772.
8. Bell, S. L., Bebbington, C., Scott, M. F., Wardell, J. N., Spier, R. E., Bushell, M. E., Sanders, P. G. Genetic engineering of Hybridoma glutamine metabolism. Enzyme Microb. Technol. 17:98-106.
9. Bode, J., Schlake, T., Rios-Ramirez, M., Mielke, C., Stengert, M., Kay, V., Klehr-Wirth, D. "Matrix-attached regions: Structural properties creating transcriptionally active loci." In: the International Review of Cytology series on "Structural and functional organization of the nuclear matrix". Ed: Berezney, R., Jeon, K.W., Academic Press; 1995:389-453.
10. Boxer, E. G, Devlin, M. T. Pathways of intracellular hydrogen transport. absence of enzymatic hydorgen-carrying systems is a factor in aerobic glycolysis of malignant tissue. Science. 1961; 134(3489):1495-1501.

- 
11. Birch J. R., Boraston R. C., Metcalfe H., Brown M. E., Bebbington C. R., Field R. P. Selecting and designing cell lines for improved physiological characteristics. Cytotechnology. 1994; 15:11-16.
  12. Bibila, A. T, Ranucci, S. C, Glazomitsky, K., Buckland, C. B, Aunins, G. J. Monoclonal antibody process development using medium concentrates. Biotechnol. Prog. 1994; 10:87-96.
  13. Blascovics, M. E., Ng, W. G., Donnell, G. N. Prenatal diagnosis and a case report of isovaleric acidaemia. J. Inher. Metab. Dis. 1978; 1:9-10.
  14. Brewster, N. K., Val, D. L., Walker, M. E., Wallace, J. C. Regulation of Pyruvate Carboxylase Isozyme (PYC1, PYC2) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and nonfermentative growth. Arch. Biochem. Biophys. 1994; 311(1):62-71.
  15. Butler, M., Spier, E. R. The effects of glutamine utilization and ammonia production on the growth of BHK cells in microcarrier cultures. J. Biotechnol. 1984; 1:187-196.
  16. Cain, C. C., Murphy, F. R. Growth inhibition of 3T3 fibroblasts by lysosomotropic amines: Correlation with effects on intravesicular pH but not vacuolation. J. Cell. Physiol. 1986; 129:65-70.
  17. Cameron D. C., Tong, I.-T. Cellular and metabolic engineering. An Overview. Appl. Biochem. Biotechnol. 1993; 38:105-140.
  18. Capiaumont, J., Legrand, C., Carbonell, D., Dousset, B., Belleville, F., Nabet, P. Methods for reducing the ammonia in hybridoma cell cultures. J. Biotechnol. 1995; 39:49-58.
  19. Cazzulo, J. J., Stoppani, A. O. M. Purification and properties of pyruvate carboxylase from Baker's Yeast. Arch. Biochem. Biophys. 1967; 121:596-608.
  20. Cederbaum, I. A, Rubin, E. Fatty acid oxidation, substrate shuttles, and activity of the citric acid cycle in hepatocellular carcinomas of varying differentiation. Cancer Res. 1976; 36:2980-2987.
  21. Chang, D. Y-H, Grodzinsky, J. A, Wang, C. D. I. In-situ removal of ammonium and lactate through electrical means for hybridoma cultures. Biotech. Bioeng. 1995a; 47:308-318.
  22. Chang, D. Y-H., Grodzinsky, J. A., Wang, C. D. I. Nutrient enrichment and in-situ waste removal through electrical means for hybridoma cultures. Biotech. Bioeng. 1995b; 47:319-326.



- 
23. Cherlet, M., Marc, A. Intracellular pH monitoring as a tool for the study of hybridoma cell behavior in batch and continuous bioreactor cultures. Biotechnol. Prog. 1998; 14:626-638.
  24. Chiaretti, B., Casciaro, A., Minotti, G., Eboli, L. M., Galeotti, T. Quantitative evaluation of the activity of the malate-aspartate shuttle in Ehrlich ascites tumor cells. Cancer Res. 1979; 39:2195-2199.
  25. Condreay, J. P., Klein, J.-L., Clay, C. W, Witherspoon, M. S, Dixon, P. E, Kurdum, M., Kost, A. T. Transient and stable gene expression in mammalian cells mediated by recombinant baculovirus vectors. The 16th ESACT meeting abstract book. 1999, 37.
  26. Coté, J., Bourget, L., Garnier, A., and Kamen, A. Study of adenovirus production in serum-free 293SF suspension culture by monitoring GFP-expression. Biotechnol. Prog. 1997; 13(6):709-714.
  27. Devaux, B., Lefrancois, D., Crepin, M. Transcription of integrated MMTV LTR DNA in fibroblast clones is not associated with DNA methylation but with the integration site. Biochimie. 1985; 67(7-8):853-860.
  28. Dietzen, J. D., Davis, J. E. Oxidation of pyruvate, malate, citrate and cytosolic reducing equivalents by AS-30D Hepatoma mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 1993; 305(1):91-102.
  29. Dirks, W., Wirth, M., Hauser, H. Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells. Gene. 1993; 128:247-249.
  30. Donnelly, M., Scheffler, I. E. Energy metabolism in respiration-deficient and wild type Chinese Hamster Fibroblasts in culture. J. Cell. Physiol. 1976; 89:39-52.
  31. Dorner, A. J., Wasley, L. C., Kaufman, R. J. Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells. J. Biol. Chem. 1989; 264(34):20602-20607.
  32. Doyle, C., Butler, M. The effect of pH on the toxicity of ammonia to a murine hybridoma. J. Biotechnol. 1990; 15:91-100.
  33. Fibi, R. M, Hermentin, P., Pauly, U. J, Lauffer, L., Zettlmeissl, G. N- and O-glycosylation mutants of recombinant human erythropoietin secreted from BHK-21 cells. Blood. 1995; 85:1229-1236.
  34. Fiechter, A., Gmünder, F. K. Metabolic control of glucose degradation in yeast and tumor cells. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 1989; 39:1-28.

- 
35. Fiorani, M., Cantoni, O., Piccoli, G., Biagiarelli, B., Stocchi, V. Cell density dependent regulation of ATP levels during growth cycle of cultured Chinese hamster ovary cells. Biochem. Mol. Biol. Int. 1994; 32(2):251-258.
  36. Fitzpatrick, L., Jenkins H. A., Butler, M. Glucose and glutamine metabolism of a murine B-Lymphocyte hybridoma grown in batch culture. Appl. Biochem. Biotechnol. 1993; 43:93-116.
  37. Freytag, O. S., Collier, K. J. Molecular cloning of a cDNA for human pyruvate carboxylase. J. Biol. Chem. 1984; 259(20):12831-12837.
  38. Furukawa, K., Sugimura, K., Ohsuye, K. Increasing protein production from cultured animal cells. 1995. EP649900, 26-04-95.
  39. Ganguly, S., Sharp, A. P, RajBhandary, L. W. Saccharomyces cerevisiae SUP53 tRNA gene transcripts are processed by mammalian cell extracts in vitro but are not processed in vivo. Mol. Cell. Biol. 1988; 8(1):361-370.
  40. Garnier, A., Côté, J., Nadeau, I., Kamen, A., Massie, B. Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. Cytotechnology. 1994; 15:145-155.
  41. Gassen, G. H., Martin, A., Bertam, S. Gentechnik. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag; 1985/1, 1-125; 330-339.
  42. Gawlitzeck, M., Valley, U., Nimtz, M., Wagner, R., Conradt, H. S. Characterization of changes in the glycosylation pattern of recombinant proteins from BHK-21 cells due to different culture conditions. J. Biotechnol. 1995; 42:117-131.
  43. Gawlitzeck, M., Conradt, H.S., Wagner, R. Effect of different cell culture conditions on the polypeptide integrity and N-glycosylation of a recombinant model glycoprotein. Biotech. Bioeng. 1995; 46:536-544.
  44. Gawlitzeck, M., Nimtz, M., Wagner, R., Valley, U., Conradt, S. H. Ammonium ion and glucosamine dependent increase of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells. Biotech. Bioeng. 1998; 57(5):518-528.
  45. Gilbert, J. B., Price, V. E., and Greenstein, J. P. Effect of anions on the non-enzymatic desamidation of glutamine. J. Biol. Chem. 1949; 180:209-218.
  46. Glacken, M. W., Huang, C., Sinskey, J. A. Mathematical descriptions of hybridoma culture kinetics. III. Simulation of fed-batch bioreactors. J. Biotechnol. 1989; 10:39-66.

- 
47. Glacken, M. W. Catabolic control of mammalian cell culture. Bio/Technology. 1988; 6:1041-1050.
  48. Glacken, M. W., Fleischacker, R. J. and Sinskey, A. J. Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. Biotech. Bioeng. 1986; 28:1376-1389.
  49. Goergen L. J., Marc, A., Engasser, M. J. Influence of lactate and ammonia on the death rate of hybridoma. In: Spier, E. R, Griffiths, B. J, Berthold, W., Animal cell technology; products of today, prospects of tomorrow. Oxford: Butterworth Heinemann; 1994:161-163.
  50. Goff, S. P., and Berg, P. Construction, propagation and expression of Simian Virus 40 recombinant genomes containing the Escherichia coli gene for thymidine kinase and a *Saccharomyces cerevisiae* gene for tyrosine transfer RNA. J. Mol. Biol. 1979; 133:359-383.
  51. Gokana, A., Winchenne, J. J., Ben-Ghanem, A., Ahaded, A., Cartron, J.P., Lambin, P. Chromatographic separation of recombinant human erythropoietin isoforms. J. Chromatogr. 1997; A. 791:109-118.
  52. Goochee, C. F., Monica, T. Environmental effects on protein glycosylation. Bio/Technology. 1990; 8:421-427.
  53. Goochee, C.F., Gramer, J. M, Andersen, C. D, Bahr, B. J, Rasmussen, R. J. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. Bio/Technology. 1991; 9:1347-1355.
  54. Goss, N. H., Dyer, P. Y., Keech, D. B., Wallace, J. C. An electron microscopic study of pyruvate carboxylase. J. Biol. Chem. 1979; 254(5):1734-1739.
  55. Grammatikos, S. I., Valley, U., Nimtz, M., Conradt, H. S., Wagner, R. Intracellular UDP-N-acetyl-hexosamine pool affects N-glycan complexity: A mechanism of ammonium action on protein glycosylation. Biotechnol. Progr. 1998; 14:410-419.
  56. Greenhouse, V. W. V, Lehninger, L. A. Occurrence of the malate-aspartate shuttle in various tumor types. Cancer Res. 1976; 36:1392-1396.
  57. Häggström, L., /Spier, R., Griffiths, J.B., Meignier, B. Energetics of glutaminolysis- A theoretical evaluation. In: Production of biologicals from animal cells in culture. Oxford: Butterworths-Heinemann; 1991, 79-81.
  58. Häggström, L., Ljunggren, J., Öhman, L. Metabolic engineering of animal cells. Ann-N-Y-Acad-Sci. 1996; 782:40-52.

- 
59. Hakomori, S. A rapid permethylation of lyxolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxid. J. Biochem. 1964; 55:205-207.
  60. Hardy, R. M, Townsend, R. P. Separation of positional isomers of oligosaccharides and glycopeptides by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988; 85:3289-3298.
  61. Hassell, T., Gleave, S., Butler, M. Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. Appl. Biochem. Biotechnol. 1991; 30:29-41.
  62. Hauser, H. Heterologous expression of genes in mammalian cells. In: Hauser, H. and Wagner, R., Mammalian cell biotechnology in protein production. Berlin: Walter de Gruyter; 1997:3-32.
  63. Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J., Tzagoloff, A. Yeast/*E.coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. Yeast. 1986; 2(3):163-167.
  64. Hinkle, C. P, Yu, L. M. The phosphorous/oxygen ratio of mitochondrial oxidative phosphorylation . J. Biol. Chem. 1979; 254:2450-2455.
  65. Ingram, L.O., Conway, T., Clark, D.P., Sewell, G.W., Preston, J.F. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 1987; 53:2420-2425.
  66. Irani, N., Wirth, M., Heuvel, J. vd, Wagner, R. Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytosoplasmic pyruvate carboxylase reaction. Biotech. Bioeng. 1999, 66 (4):238-246.
  67. Jackson, J. R. The ATP requirement for initiation of eukaryotic translation varies according to the mRNA species . Eur. J. Biochem. 1991; 200:285-294.
  68. Jäger, V., Lehmann, J., Friedl, P. Serum-free growth medium fot the cultivation of a wide spectrum of mammalian cells in stirred bioreactors. Cytotechnology. 1988; 1:319-329.
  69. Karreman, C., Karreman, S., Hauser, H. Retroviral infection of Syrian Hamster BHK cells depends on age and susceptibility toward sialidase. Virology. 1996; 220:46-50.
  70. Keech, D. B., Utter, M. F. Pyruvate Carboxylase. II. Properties. J. Biol. Chem. 1963; 238(8):2609-2614.
  71. Keppler, D. O. R. Uridine triphosphate deficiency, growth inhibition, and death in ascites hepatoma cells induced by a combination of pyrimidine biosynthesis inhibition with uridylate trapping. Cancer Res. 1977; 37:911-917.

- 
72. Klehr, D., Maas, K., Bode, J. Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. Biochemistry. 1991; 30:1264-1270.
  73. Kooistra, T., Berg, vd. J., Töns, A., Platenburg, G., Rijken, D.C., Berg Van den, E. Butyrate stimulates tissue-type plasminogen-activator synthesis in cultured human endothelial cells. Biochem. J. 1987; 247:605-612.
  74. Kovacevic, Z. Possibility for the transfer of reducing equivalents from the cytosol to the mitochondrial compartment in Ehrlich ascites tumor cells by the malate-aspartate shuttle. Eur. J. Biochem. 1972; 25:372-378.
  75. Kratje, B. R, Lincoln, D. Calculation of cell culture parameters. Kalkulationsprogramm in C; 1992.
  76. Krebs, H. A. The history of the tricarboxylic acid cycle. Perspect. Biol. Med. 1970; 14:154-170.
  77. Kuchka, M., Markus, H. B., Mellman, W. J. Influence of hexose conditions on glutamine oxidation of SV-40 transformed diploid fibroblast human cell lines. Biochem. Med. 1981; 26:356-364.
  78. Kurokawa, H., Park, S. Y, Iijima, S., Kobayashi, T. Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations. Biotech. Bioeng. 1994; 44:95-103.
  79. Kvamme, E., Svenneby, G. The effect of glucose on glutamine utilization by Ehrlich ascites tumor cells. Cancer Res. 1961; 21:92.
  80. Laemmli, K. U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227:680-685.
  81. Lanks, K. W. End products of glucose and glutamine metabolism by L929 cells. J. Biol. Chem. 1987; 262:10093-10097.
  82. Lanks, K. W. Glutamine is responsible for stimulating glycolysis by L929 cells. J. Cell. Physiol. 1986; 126:319-321.
  83. Lanks, K. W., Li, P.-W. End product of glucose and glutamine metabolism by cultured cell lines. J. Cell. Physiol. 1988; 135:151-155.
  84. Lao, M. S., Toth, D. Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese Hamster ovary cell culture. Biotechnol. Prog. 1997; 13:688-691.

- 
85. Lee, K. H., Sburlati, A., Renner, W. A., Bailey, J. E. Deregulated expression of cloned transcription factor E2F-1 in Chinese Hamster Ovary cells shifts protein patterns and activates growth in protein-free medium. Biotech. Bioeng. 1996; 50(3):273-279.
  86. Lee, G. M., Varma, A., Palsson, B. O. Production of monoclonal antibody using free-suspended and immobilized hybridoma cells: effect of serum. Biotech. Bioeng., 1991; 38(8):821-830.
  87. Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D., Wolffe, A. P. A possible role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. Cell. 1993; 72:73-84.
  88. Lee, E. U., Roth, J., Paulson, J. C. Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese Hamster Ovary cells by expression of  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ -2,6-Sialyltransferase. J. Biol. Chem. 1989; 264:13848-13855.
  89. Lehmann, J., Piehl, W. G, Schulz, R. Blasenfreie zellkulturbegasung mit bewegten, porösen Membranen. Biotech-Forum. 1985; 2:112-118.
  90. Lehninger, A. L. The mitochondrion: molecular basis of structure and function. New York: The Benjamin Co. Inc.; 1964.
  91. Liao, J. C., Delgado, J. Advances in metabolic control analysis. Biotechnol. Prog. 1993; 9:221-233.
  92. Lin, A. A, Nguyen, T., Miller, W.M. A rapid method for counting cell nuclei using a particle sizer/counter. Biotechnol. Techniques. 1991; 5:153-156.
  93. Lin, A., and Agrawal, P. Glutamine decomposition in DMEM: Effect of pH and serum concentration. Biotechnol. Lett. 1988; 10:695-698.
  94. Linz, M., Zeng, P. A, Wagner, R., Deckwer, W.-D. Stiochiometry, kinetics and regulation of Glucose and amino acid metabolism of a recombinant BHK cell line in batch and continuous culture. Biotechnol. Prog. 1997; 13:453-463.
  95. Ljunggren, J., Häggström, L. Glutamine limited fed-batch culture reduces the overflow metabolism of amino acids in myeloma cells. Cytotechnology. 1992; 8:45-56.
  96. Ljunggren, J., Häggström, L. Catabolic control of hybridoma cells by glucose and glutamine limited fed batch cultures. Biotech. Bioeng. 1994; 44:808-818.
  97. Ljunggren, J., Häggström, L. Specific growth rate as a parameter for tracing growth-limiting substances in animal cell cultures. J. Biotechnol. 1995; 42:163-175.

- 
98. López-Alarcón, L., Eboli, M-L. Oxidation of reduced cytosolic nicotinamide adenine dinucleotide by the malate-aspartate shuttle in the K-562 Human Leukemia cell line. Cancer Res. 1986; 46:5589-5591.
  99. Luan, T. Y, Mutharasan, R., Magee, E. W. Effect of various glucose/glutamine ratios on hybridoma growth, viability and monoclonal antibody formation. Biotechnol. Lett. 1987; 9:535-538.
  100. MacDonald, J. M. Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in Pancreatic islets - Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. J. Biol. Chem. 1995; 270(34):20051-20058.
  101. Maitland, J. N, McDougall, K. J. Biochemical transformation of mouse cells by fragments of herpes simplex virus DNA. Cell. 1977; 11:233.
  102. Marco, R., Sols, A. Metabolic crossroads in gluconeogenesis and its enzymatic regulation in liver. FEBS Symposium. 1969; 19:63-76.
  103. Martinelle, K., Westlund, A., Häggström, L. Ammonium ion transport - a cause of cell death. Cytotechnology. 1996; 22:251-254.
  104. Martinelle, K., Westlund, A., Häggström, L. Saturable ammonium ion transport in myeloma and hybridoma cells is mediated by the  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$  -cotransporter. Biotechnol. Lett. 1998; 20(1):81-86.
  105. Martinelle, K., Häggström, L. Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: Transport across cell membranes. J. Biotechnol. 1993; 30:339-350.
  106. McKeehan, W. L. Glutaminolysis in animal cells. ed. Morgan MJ, In: Carbohydrate metabolism in cultured cells: Plenum Press; 1986:111-150.
  107. McKeehan, W. L., Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. Cell. Biol. Int. Reports. 1982; 6:635-650.
  108. McQueen, A., Bailey, J. E. Growth inhibition of hybridoma cells by ammonia ion: correlation with effects on intracellular pH. Bioprocess Engineering. 1991; 6:49-61.
  109. Mildvan, S. A, Scrutton, C. M, Utter, F. M. Pyruvate Carboxylase. VII. A possible role for tightly bound manganese. J. Biol. Chem. 1966; 241(15):3488-3498.
  110. Miller, W. M., Blanch, H. W., Wilke, C., R. The effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. J. Cell. Physiol. 1987; 132:524-530.

- 
111. Miller, W. M., Wilke, C. R., Blanch, H. W., Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture. Bioprocess Engineering. 1988a; 3:113-122.
  112. Miller, W. M., Blanch, H. W., Wilke, C. R. A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: Effect of nutrient concentration, dilution rate and pH. Biotech. Bioeng. 1988b; 32:947-965.
  113. Misaizu, T., Matsuki, S., Strickland, T. W., Takeuchi, M., Kobata, A., Takasaki, S. Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. Blood. 1995; 86(11):4097-4104.
  114. Murray, K., Dickson, J. A, Gull, K. Metabolic management of a hybridoma cell line. ESACT, The 11th meeting , vol. 11; 1992:261-263.
  115. Neermann, J., Wagner, R. Comparative analysis of glucose and glutamine in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. J. Cell. Physiol. 1996; 166:152-169.
  116. Navye Jr., F. R. P., Misato, T., Matsumura, M. and Kataoka, H. Hbs-MAb production in perfusion culture with selective ammonia removal systems. J. Biotechnol. 1994; 34:217-225.
  117. Neermann, J. Charakterisierung des Primärenergiemetabolismus von Dauerzelllinien und seine gerichtete Veränderung durch Metabolic Control und Metabolic Engineering. Dissertation, TU Braunschweig. 1996.
  118. Negrotti, M., Murray, K., Reidy, T. J., Krok, K., Seaver, S. S. Effects of glutamine and ammonia on hybridoma cell proliferation and antibody production/ Proceedings of the second engineering foundation conference on animal cell culture: Santa Barbara; 1989:65.
  119. Newland, M., Greenfield, P. F., Reid, S. Hybridoma growth limitations: The roles of energy metabolism and ammonia production. Cytotechnology. 1990; 3:215-229.
  120. Newsholme, P., Curi, R., Gordon, S., Newsholme, A. E. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. Biochem. J. 1986; 239:121-125.
  121. Nielsen, J. Metabolic engineering: Techniques for analysis of targets for genetic manipulations. Biotech. Bioeng. 1998; 58:125
  122. Nimtz, M., Martin, W., Wray, V., Klöppel, K-D., Augustin, J., Conradt, H. S. Structures of sialylated oligosaccharides of human erythropoietin expressed in recombinant BHK-21 cells. Eur. J. Biochem. 1993; 213:39-56.



- 
123. Oh, W. SK, Vig, P., Teo, W., K., Yap, S., MG. Substantial overproduction of antibodies by applying osmotic pressure and sodium butyrate. Biotech. Bioeng. 1993; 42:601-610.
  124. Ohta, K., Beall, D. S., Mejia, J. P., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* MSA1 for ethanol production from xylose and glucose. Appl. Environ. Microbiol. 1991; 57:2810-2815.
  125. Oizumi, J., Ng, W.G., Donnell, G.N.. Pyruvate Carboxylase defect: Metabolic studies on cultured skin fibroblasts. J. Inher. Metab. Dis. 1986; 9:120-128.
  126. Olsen, J. C., Sechelski, J. Use of sodium butyrate to enhance the production of retroviral vectors expressing CFTR cDNA. Hum-Gene-Ther. 1995; 6(9):1195-1202.
  127. Omasa, T., Higashiyama, K.-I., Shioya, S., Suga, K.-I. Effects of lactate concentration on Hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation. Biotech. Bioeng. 1992; 39:556-564.
  128. Osmani, A. S, Scrutton, C. M, Mayer, F. The structure and regulation of fungal Pyruvate Carboxylases. Ann. NY Acad. Sci. 1985; 447:56-71.
  129. Oyaas, K., Ellingsen, E. T, Dyrset, N., Levine, W. D. Hyperosmotic hybridoma cell cultures: increased monoclonal antibody production with addition of glycine betaine. Biotech. Bioeng. 1994; 44:991-998.
  130. Ozturk, S. S, Palsson, B. O. Effect of dissolved oxygen on hybridoma growth, metabolism, and antibody production in continuous culture. Biotechnol. Prog. 1990; 6:437-446.
  131. Ozturk, S. S and Palsson, B. O. Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: Effect of media type, pH and serum concentration. Biotechnol. Prog. 1990; 6:121-128.
  132. Ozturk, S. S, Palsson, B. O. Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. Effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration and medium pH in a batch reactor. Biotechnol. Prog. 1991; 7:481-494.
  133. Ozturk, S. S, Riley, M. R., Palsson, B. O. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. Biotech. Bioeng. 1992; 39:41-432.
  134. Parvin, R., Caramancion, M. N. V., Pande, S. V. Convenient rapid determination of picomole amounts of oxaloacetate and aspartate. Anal. Biochem. 1980; 104:296-299.

- 
135. Pels Rijcken, R. W, Overdijk, B., Eijnden, H. vd. D, Ferwerda, W. The effect of increasing nucleotide-sugar concentrations on the incorporation of sugar into glycoconjugates in rat hepatocytes. Biochem. J. 1995; 305:865-870.
  136. Pendse, J. G, Bailey, J. E. Effect of Vitreoscilla Hemoglobin expression on growth and specific tissue plasminogen activator productivity in recombinant Chinese Hamster Ovary cells. Biotech. Bioeng. 1994; 44:1367-1370.
  137. Perez-Rodriguez, J., Sanchez-Jimenez, F., Marquez, J. F., Medina, A. M., Quesada, R. A., Castro Nunez de, I. Malate-citrate cycle during glycolysis and glutaminolysis in Ehrlich ascites tumor cells. Biochimie. 1987; 69:469-474.
  138. Petch, D., Butler, M. Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: Glucose and glutamine utilization. J. Cell. Physiol. 1994; 161:71-76.
  139. Pirt, J. S. Principles of microbe and cell cultivation. Cambridge: Blackwell Scientific publications; 1975.
  140. Poljak, L., Seum, C., Mattioni, T., Laemmli, U.K. SARs stimulate but do not confer position independent gene expression. Nucleic acids research. 1994; 22(21):4386-4394.
  141. Randle, J. P., Fatania, R. H., Lau, S. K. Regulation of the mitochondrial branched chain 2-oxoacid dehydrogenase complex of animal tissue by reversible phosphorylation. In: Cohen, P., Molecular aspects of cellular regulation, vol. 3. Amsterdam: Elsevier; 1984:1.
  142. Reddy, S., Bauer, K. D., Miller, W. M. Determination of antibody content in live versus dead hybridoma cells: Analysis of antibody production in osmotically stressed cultures. Biotech. Bioeng. 1992; 40:947-964.
  143. Reddy, S., Miller, W. M. Effects of abrupt and gradual osmotic stress on antibody production and content in hybridoma cells that differ in production kinetics. Biotechnol. Prog. 1994; 10:165-173.
  144. Rees W. D., Flint, H. J., Fuller, M. F. A molecular biological approach to reducing dietary amino acid needs. Biotechnology. 1990; 8:629-632.
  145. Rees, D. W, Hay, M. S. The biosynthesis of threonine by mammalian cells: expression of a complete bacterial biosynthetic pathway in an animal cell. Biochem. J. 1995; 309:999-1007.
  146. Reed, L. J., Damuni, Z., Merryfield, M. L. Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation-dephosphorylation. Curr. Top. Cell. Regul. 1985; 27:41-49.

- 
147. Reitzer, L. J., Wice, M. B., Kennell, D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major source for cultured HeLa cells. J. Biol. Chem. 1979; 254(8):2669-2676.
  148. Reitzer, L. J., Wice, M. B., Kennell, D. The Pentose cycle. Control and essential function in HeLa cell nucleic acid synthesis. J. Biol. Chem. 1980; 255(12):5616-5626.
  149. Renard, J. M., Spagnoli, R., Mazier, C., Salles, M. F., Mandine, E. Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of viable cells in batch systems. Biotechnol. Lett. 1988; 10:91-96.
  150. Renner, W. A., Lee, K. H., Hatzimanikatis, V., Bailey, J. E., Eppenberger, H. M. Recombinant cyclin E expression activates proliferation and obviates surface attachment of Chinese Hamster Ovary (CHO) cells in protein free medium. Biotech. Bioeng. 1995; 47:47-482.
  151. Reuveny, S., Velez, D., Miller, L., Macmillan, J. D. Comparison of cell propagation methods for their effect on monoclonal antibody yield in fermentors. J. Immunol. Methods. 1986a; 86:61-69.
  152. Robinson, B. H. Lacticacidemia: Biochemical, clinical, and genetic considerations. Adv-Hum-Genet. 1989; 18:151-179.
  153. Robinson, B. H., and Halperin, M. L. Transport of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide into mitochondria of rat white adipose tissue. Biochem. J. 1970; 116(2):229-233.
  154. Rogers, D. T., Szostak und J. W., Yeast strains. PCT Int. Appl. WO 87/3006; Chem. Abstr./107/1987/234858r.
  155. Rohde, M., Lim, F., Wallace, J. C. Electron microscopic localization of pyruvate carboxylase in rat liver and *Saccharomyces cerevisiae* by immunogold procedures. Arch. Biochem. Biophys. 1991; 290(1):197-201.
  156. Romein, B., Vriezen, N., Heijnen, J. J., Dijken van, P. J., Luyben, M. K. Ch. A. The use of a metabolic network to quantify the energetics of mammalian cells. Biotech. Bioeng. 1998; in press.
  157. Ruiz-Amil, M., De Torrontegui, G., Palacian, E., Losada, M. Properties and function of yeast pyruvate carboxylase. J. Biol. Chem. 1965; 240:3485-3492.
  158. Ryll, T., Valley, U., Wagner, R. Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. Biotech. Bioeng. 1994; 44:184-193.

- 
159. Ryll, T., Lucki-Lange, M., Jäger, V., Wagner, R. Production of recombinant human interleukin-2 with BHK cells in a hollow fibre and a stirred tank reactor with protein-free medium. J. Biotechnol. 1990; 14:377-392.
  160. Ryll, T., Wagner, R. Improved ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the quantification of a wide variety of nucleotids and sugar-nucleotides in animal cells. J. Chromatogr. 1991; 570:77-88.
  161. Ryll, T., Wagner, R. Intracellular ribonucleotide pools as a tool for monitoring the physiological state of in vitro cultivated cells during production process. Biotech. Bioeng. 1992; 40:934-946.
  162. Ryll, T. Untersuchung intrazellulärer Ribonucleotidpools tierischer Zellkulturen für die Kontrolle von Produktions-prozessen. Dissertation, TU Braunschweig. 1992.
  163. Ryu, S. J., Lee, G. M. Application of hypoosmolar medium to fed-batch culture of hybridoma cells for improvement of culture longevity. Biotech. Bioeng. 1999; 62(1):120-123.
  164. Ryu, S. J, Lee, G., M. Effect of hypoosmotic stress on hybridoma cell growth and antibody production. Biotech. Bioeng. 1997; 55:565-570.
  165. Sambrook, J., Fritsch, F. E, Maniatis, T. Molecular cloning: A laboratory manual , vol. 1-3, 2nd edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press; 1989.
  166. Sánchez-Jiménez, F., Martínez, P., Núñez de Castro, I., Olavarría, J. S. The function of redox shuttles during aerobic glycolysis in two strains of Ehrlich ascites tumor cells. Biochimie. 1985; 67:259-264.
  167. Savinell, J. M., Lee, G. M., Palsson, B. O. On the orders of epigenic dynamics and monoclonal antibody production. Bioproc. Eng. 1989; 4:231-234.
  168. Schlenke, P. Konstruktion von rekombinanten Säugerzelllinien mit neuen Glycosylierungseigenschaften zur Produktion von humanidentisch glycosylierten Pharmaproteinen. Dissertation, Universität Hannover. 1999.
  169. Schlenke, P., Grabenhorst, E., Nimtz, M., Conradt, H. S. Construction and characterization of stably transfected BHK-21 cells with human-type sialylation characteristics: transfection with the human  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase gene leads to the biosynthesis of recombinant glycoproteins bearing NeuAc( $\alpha$ -2-6)Gal( $\beta$ -1-4)GlcNAc-R and NeuAc( $\alpha$ -2-6)GalNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc-R N-glycan motifs. Cytotechnology. 1999; 30:17-25.
  170. Schneider, M., Marison, I. W., Stockar, U. v. The importance of ammonia in mammalian cell culture, J. Biotechnol. 1996; 46:161-185.

- 
171. Scrutton, M. C., Olmsted, M. R., Utter, M. F., ed: Lowenstein, J. M. Pyruvate Carboxylase from chicken liver. *Methods in Enzymology: Citric acid cycle*, vol. 13/38; 1969:235-249.
  172. Shiomi, N., Fukuda und H., Gene capable of enhancing S-adenosyl L-methionine accumulation and process for producing S-adenosyl-L-methionine using the same. 5.100.786, 1992.
  173. Singh, R. P., Emery, A. N., Al-Rubeai, M. Enhancement of survivability of mammalian cells by overexpression of the apoptosis-suppressor gene bcl-2. Biotech. Bioeng. 1996; 52(1):166-175.
  174. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 1985; 150:76-85.
  175. Stephanopoulos, G., Vallino, J. J. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. Science. 1991; 252:1675-1681.
  176. Stephanopoulos, G., Sinskey, A. J. Metabolic engineering - methodologies and future prospects. Biotechnology. 1993; 11:392-396.
  177. Stephanopoulos, G. Metabolic engineering. Current Opinion in Biotechnology. 1994; 5:196-200.
  178. Stryer, L. Biochemie. Heidelberg: Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft; 1990/1.
  179. Stucka, R., Dequin, S., Salmon, J.-M., Gancedo, C. DNA sequences in chromosomes II and VII code for pyruvate carboxylase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of pyruvate carboxylase deficient strains. Mol. Gen. Genet. 1991; 229:307-315.
  180. Thorens, B., Vassalli, P. Chloroquine and ammonium chloride prevent terminal glycosylation of immunoglobulins in plasma cells without affecting secretion. Nature. 1986; 321:618-620.
  181. Tritsch, G. L., Moore, G. E. Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media. Exp. Cell. Res. 1962; 28:360-364.
  182. Tsuda, T., Kawanishi, G., Ueda, M., Masuda, S., Sasaki, R. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. Eur. J. Biochem. 1990; 188:405-411.
  183. Urlaub, G., Chasin, L. A. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980; 77:4216-4220.

- 
184. Utter, F. M., Barden, E. R., Taylor, L. B. Pyruvate carboxylase: an evaluation of the relationships between structure and mechanism and between structure and catalytic activity. Adv. Enzymol. 1975; 42:1-72.
  185. Utter, M. F. and Keech, D. B. Pyruvate Carboxylase I. Nature of the reaction. J. Biol. Chem. 1963; 238(8):2603-2608.
  186. Van den Heuvel, J. The effect of mRNA structure on translational efficiency in yeast. Dissertation. Universität Amsterdam. 1990.
  187. Vaughn, L. J., Goodwin, H. R., Tompkins, J. G., McCawley, P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). In Vitro. 1977; 13:213-217.
  188. Valley, U. UDP-aktivierte N-acetylierte Hexosamine als zentrale Effektoren bei Wachstum und Protein-glycosylierung in rekombinanten BHK-Zellen. Dissertation, TU Braunschweig. 1996.
  189. Valley, U., Nimtz, M., Conradt, S. H., Wagner, R. Incorporation of ammonium into intracellular UDP-activated N-Acetylhexoamines and into carbohydrate structures in glycoproteins. Biotech. Bioeng. 1999, 64:402-417.
  190. Vriezen, N. Physiology of mammalian cells in suspension culture. Dissertation, Technische Universität Delft. 1998.
  191. Vriezen, N., and Dijken Van, J.P. Fluxes and enzyme activities in central metabolism of myeloma cells grown in chemostat culture. Biotech. Bioeng. 1998; 59(1):28-39.
  192. Wagner, R., Irani, N., Wirth, M., and vd. Heuvel, Methods for the improvement of the primary metabolism of mammalian cell lines, International Patent PCEP 98/07484, 1998.
  193. Wagner, R., Ryll, T., Krafft, H., Lehmann, J. Variation of amino acid concentrations in the medium of hu  $\beta$ -IFN and hu IL-2 producing cell lines. Cytotechnology. 1988; 1:145-150.
  194. Wagner, R. Metabolic control of animal cell culture processes. In: Hauser, H. and Wagner, R., Mammalian cell biotechnology in protein production. Berlin: Walter de Gruyter; 1997:193-232.
  195. Walker, M. E., Val, D. L., Rohde, M., Devenish, R. J., Wallace, J. C. Yeast pyruvate carboxylase: Identification of two genes encoding isoenzymes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991; 176:1210-1217.
  196. Warburg, O. The metabolism of tumors. London: Constable; 1930.

- 
197. Wasley, L. C., Timony, G., Murtha, P., Stoudemire, J., Dorner, A. J., Caro, J., Krieger, M., Kaufman, R. J. The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biologic activities of erythropoietin. Blood. 1991; 77(12):2624-2632.
  198. Watson, E., Yao, F. Capillary electrophoretic separation of human recombinant erythropoietin (r.HuEPO) glycoforms. Analytical Biochemistry. 1993; 210:389-393.
  199. Watson, D. J, Hopkins, H. N, Roberts, W. J, Steitz, A. J, Weiner, A. M., ed: Gillan, R. J. Molecular biology of the gene. Menlo Park: The Benjamin/Cummings publishing company Inc.; 1987/4.
  200. Wirth, M., Schumacher, L., Hauser, H. Use of dicistronic transcription units for the correlated expression of two genes in mammalian cells . Eds: Spier, R. E., Griffiths, J. B., and Meignier, B., London: Butterworth; 1991:328-343.
  201. Wirth, M. Isolation of recombinant cell clones exhibiting high-level expression of the introduced gene. In: Hauser, H. and Wagner, R., Mammalian cell biotechnology in protein production. Berlin: Walter de Gruyter; 1997:121-137.
  202. Wirth, M., and Hauser, H. Genetic engineering of animal cells. Ed: Pühler, A., Weinheim: VCH Publishers; 1993:1-82.
  203. Wirth, M., Hoexter, M., Morelle, C., and Hauser, H. Bicistronic expression vectors facilitate screening for overexpressing mammalian cells, Weinheim: VCH Publishers; 1990:69-73.
  204. Wood, H. G., Barden, R. E. Biotin enzymes. Ann. Rev. Biochem. 1977; 46:385-413.
  205. Wu, P., Ray, G. N, Shuler, L. M. A computer model for intracellular pH regulation in Chinese Hamster ovary cells. Biotechnol. Prog. 1993; 9:374-384.
  206. Wurm, F. M., Gwinn, K. A., Kingston, R. E. Inducible overexpression of the mouse c-myc protein in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986; 83:5414-5418.
  207. Xie, L., Wang, D. I. C. Stochiometric analysis of animal cell growth and its application in medium design. Biotech. Bioeng. 1994a; 43:1164-1174.
  208. Xie, L., Wang, D. I. C. Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies. Biotech. Bioeng. 1994b; 43:1175-1189.
  209. Yamaguchi, K., Akai, K., Kawanishi, G., Ueda, M., Masuda, S., Sasaki, R. Effects of site-directed removal of N.glycosylation sites in human erythropoietin on its production and biological properties. J. Biol. Chem. 1991; 266(30):20434-20439.

- 
210. Yarmush, M. L., Berthiaume, F. Metabolic engineering and human disease. Nature Biotechnology. 1997; 15:525-528.
  211. Zeng, P. A, Deckwer, D. W. Mathematical modeling and analysis of glucose and glutamine utilization and regulation in cultures of continuous mammalian cells. Biotech. Bioeng. 1995; 47:334-346.
  212. Zetterberg, A., Engstrom, W. Glutamine and the regulation of DNA replication and cell multiplication in fibroblasts. J. Cell. Physiol. 1981; 108:365-373.
  213. Zhang, G., Gurtu, V., and Kain, S. R. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1996; 227:707-711.
  214. Zielke, H. R., Ozand, P. T., Tildon, J. T., Sevdalian, D. A., Cornblath, M. Growth of human diploid fibroblasts in the absence of glucose utilization . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976; 73(11):4110-4114.
  215. Zielke, H. R., Ozand, P. T., Tilson, J. T. Reciprocal regulation of glucose and glutamine utilization by cultured human diploid fibroblasts. J. Cell. Physiol. 1978; 95:41-48.
  216. Zielke, H. R., Sumbilla, C. M., Sevdalian, D. A., Hawkins, R. L., Ozand, P. T. Lactate: A major source of glutamine metabolism by human diploid fibroblasts. J. Cell. Physiol. 1980; 104:433-441.
  217. Zielke, H. R., Zielke, C. L., Ozand, P. T. Glutamine: A major energy source for cultured mammalian cells. Fed. Proceed. 1984; 43(1):121-125.





# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Noushin Irani  
Geboren am 05.09.1971  
in Teheran/Iran

## Schulbildung:

1977 - 1981	Grundschule in Teheran und Panchgani (Indien)
1981 - 1983	Orientierungsstufe in Braunschweig
1983 - 1990	Gymnasium Martino Katharineum in Braunschweig
	Abschluß: allgemeine Hochschulreife

## Studium:

Okt. 1990 - Mai 1996	Studium der Biotechnologie, Technische Universität Braunschweig
Sept. 1994- Jan. 1995	Studienarbeit in der Abteilung Zellkulturtechnik der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig. Thema: Einfluß von Adenosinmonophosphat auf den intrazellulären Nukleotidpool von kontinuierlichen Säugerzelllinien
Juni 1995- Feb. 1996	Diplomarbeit in der Abteilung Cell Culture and Fermentation R&D der Firma Genentech Inc. in South San Francisco, USA. Thema: Einfluß von Butyrat auf die Transfektionseffizienz einer Pharmaprotein produzierenden CHO Zelllinie
Sept. 1996- Sept. 1999	Promotion an der GBF Braunschweig in der Abteilung Zellkulturtechnik
seit Okt. 1996	Aufbaustudium Wirtschaftswissenschaften an der TU Braunschweig

## Berufstätigkeit:

Sept. 1996- Nov. 1999	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Zellkulturtechnik der GBF
seit Jan. 2000	Business Development und Projektmanagement Tätigkeit bei der Boehringer Ingelheim GmbH



## **Publikationen**

*Irani, N.*, Wirth, M., Van den Heuvel, J., Wagner, R. Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction, *Biotech. Bioeng.*, 1999, 66 (4):238-246.

## **Tagungsbeiträge**

*Irani, N.*, Wirth, M., Van den Heuvel, J., Wagner, R. (1998) Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a pyruvate carboxylase reaction pathway, Presentation 216th ACS meeting, Boston, USA.

*Irani, N.*, Wirth, M., Van den Heuvel, J., Beccaria, A. J., Wagner, R. (1999) Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a pyruvate carboxylase reaction pathway, Presentation 16th ESACT-meeting, Lugano, Switzerland.

Schulz, C., *Irani, N.*, Wirth, M., Van den Heuvel, J., Wagner, R. Directed optimization of the energy metabolism of mammalian production cell lines (Poster) 16th ESACT-meeting, Lugano, Switzerland.

## **Patente**

Wagner, R., *Irani, N.*, Wirth, M., Van den Heuvel, J. Methods for the improvement of the primary metabolism of mammalian cell lines. Internationales Patent PCEP 98/07484 vom 20.11.1998.



